

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 929**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/542** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2012 PCT/US2012/032587**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12139040**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2012 E 12768275 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2019 EP 2694964**

54 Título: **Cribado de alto rendimiento para compuestos que modulan los niveles de macromoléculas celulares**

30 Prioridad:

**07.04.2011 US 201161472962 P**

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

**09.03.2020**

73 Titular/es:

**THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)  
10550 North Torrey Pines Road  
La Jolla, US**

72 Inventor/es:

**LASMEZAS, CORINNE y  
WEISSMANN, CHARLES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 746 929 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

Cribado de alto rendimiento para compuestos que modulan los niveles de macromoléculas celulares

### **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 61/472,962 titulada "HIGH-THROUGHPUT SCREENING FOR COMPOUNDS MODULATING LEVELS OF CELLULAR MACROMOLECULES", presentada el 7 de abril de 2011.

### **Campo de la invención**

10 Las realizaciones se dirigen a procedimientos para la cuantificación de componentes celulares específicos ("dianas") mediante un ensayo basado en FRET que no requiere la unión de las dianas a una fase sólida ni la separación de la diana del exceso de reactivos, haciéndolo adecuado para el cribado de alto rendimiento. El ámbito de la protección está definido por las reivindicaciones adjuntas.

### **Antecedentes**

15 La cuantificación de una macromolécula específica (la "diana"), particularmente, en presencia de otros componentes, en particular, de una proteína específica en la superficie celular, en una mezcla de proteínas, en un homogeneizado celular, se realiza comúnmente con el uso de un anticuerpo que reconoce específicamente a la diana. Por lo general, primero se inmoviliza la mezcla de proteínas en un soporte, por ejemplo, mediante adsorción o enlace covalente a una membrana o a una superficie de plástico, o a una superficie de soporte a la que se haya unido un anticuerpo específico para la diana ("anticuerpo inmovilizador"), y se expone a un anticuerpo específico de la diana ("anticuerpo primario", diferente del anticuerpo inmovilizador, si se usó alguno). Tras un tiempo de reacción apropiado, se elimina el exceso de anticuerpo primario mediante repetidos lavados, y se determina la cantidad de anticuerpo unido mediante uno de 20 varios procedimientos. Por ejemplo, se puede haber unido el anticuerpo primario covalentemente a un marcador fluorescente y puede detectarse midiendo la intensidad de la fluorescencia; como alternativa, un anticuerpo "secundario" (marcado con un marcador, tal como un colorante fluorescente o una enzima) dirigido contra el anticuerpo primario, puede usarse para la cuantificación. Existen muchos enfoques diferentes para la cuantificación del anticuerpo primario, pero es común a todos el requisito de eliminar por completo cualquier anticuerpo primario o secundario que no esté unido a la diana, porque daría lugar a una señal indistinguible de la de un anticuerpo unido específicamente. Debido a que el cribado de alto rendimiento no permite las etapas de lavado, los enfoques mencionados anteriormente no son aplicables.

30 Megan Simmer: "FLOW CYTOMETRY: A TECHNOLOGY TO COUNT AND SORT CELLS", 6 de octubre de 2006 (06-10-2006), describe una inmunofluorescencia de superficie celular clásica contra dos moléculas de superficie diferentes.

E. ZAHAVY Y COL.: "Detection of Frequency Resonance Energy Transfer Pair on Double-Labeled Microsphere and Bacillus anthracis Spores by Flow Cytometry", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 69, n.º 4, 1 de abril de 2003 (01-04-2003), páginas 2330-2339, describe un estudio que usa FRET intermolecular clásica similar al procedimiento usado para estudiar las interacciones ligando-proteína.

35 YANN GAMBIN Y COL.: "Multicolor single-molecule FRET to explore protein folding and binding", MOLECULAR BIOSYSTEMS, vol. 6, n.º 9, 1 de enero de 2010 (01-01-2010), página 1540, describe el uso de FRET para investigar el plegamiento y la unión de proteínas.

40 NOINAJ NICHOLAS Y COL.: "Conformational changes in neu ropeptidases", FASEB JOURNAL, vol. 19, n.º 4, Supl. S., Parte 1, 4 de marzo de 2005 (04-03-2005), página A306, describe el uso de FRET para investigar los cambios estructurales de una proteína, de manera destacable, una enzima que cambia la configuración durante su ciclo catalítico.

45 C. S. LEBAKKEN Y COL.: "Development and Applications of a BroadCoverage, TR-FRET-Based Kinase Binding Assay Platform", JOURNAL OF BIOMOLECULAR SCREENING, vol. 14, n.º 8, 29 de junio de 2009 (29-06-2009), páginas 924-935, describe un ensayo de unión para identificar inhibidores de quinasas que compiten con la unión entre la quinasa y el marcador.

S. LU Y COL.: "Fluorescence Resonance Energy Transfer Biosensors for Cancer Detection and Evaluation of Drug Efficacy", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 16, n.º 15, 28 de julio de 2010 (28-07-2010), páginas 3822-3824, describe el uso de FRET para sondear un cambio de configuración de una quinasa tras la fosforilación.

50 Y. E. KARAPETYAN Y COL.: "Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as antiprion agents", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 110, n.º 17, 1 de abril de 2013 (01-04-2013), páginas 7044-7049, describen un ensayo de alto rendimiento habilitado para PrP-FRET (PrP-FEHTA) para cribar compuestos que disminuyan la expresión de PrP.

### **Sumario**

El presente Sumario se proporciona para presentar un resumen de la invención para indicar brevemente la naturaleza y la sustancia de la invención. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar ni limitar el ámbito ni el significado de las reivindicaciones.

5 Las realizaciones se dirigen a un procedimiento de cribado, en particular, en un modo de alto rendimiento, en solución homogénea para compuestos que modulan la expresión de una macromolécula específica, la "diana", incluyendo, pero sin limitación, una proteína específica o un ácido nucleico específico. En una realización preferida, al menos dos dianas específicas, ligandos que permiten la FRET, se dirigen contra al menos dos sitios distintos específicos en la macromolécula, un ligando se une a al menos un fluoróforo donante y el otro a al menos un fluoróforo receptor. Los ejemplos de ligandos que permiten la FRET, incluyen, pero sin limitación: anticuerpos, miméticos de anticuerpos, peptoides, péptidos o aptámeros de ácido nucleico. Las realizaciones permiten el cribado de alto rendimiento de compuestos capaces de modificar las cantidades de una macromolécula específica en una muestra biológica.

Otros aspectos se describen más abajo.

### **Breve descripción de los dibujos**

15 Las Figuras 1A-1B son gráficos que muestran el cribado de PrP en la superficie de las células LD9 vivas usando el ensayo de cribado de PrP en el formato de 96 pocillos. Las células con desactivación de PrP (KO) que carecen de expresión de PrP se usan como control negativo. Los niveles de PrP se expresan como [% Delta F], que es un valor resultante de la medición radiométrica de la señal de HTRF correspondiente al cribado de PrP. Figura 1A: Cribado de PrP en función del número de células y el efecto del tratamiento con brefeldina A (BFA). Z' es un parámetro estadístico que mide la calidad de un ensayo ( $Z' > 0,5$  se considera un ensayo excelente). El Z' del ensayo fue de 0,7 cuando se usaron células LD9 de 20K o 40K, y de 0,8 para las células LD9 de 80K. Figura 1B: Cribado de PrP después del tratamiento de células LD9 con dosis crecientes de BFA durante 24 horas; 4 y 8  $\mu\text{g/ml}$  reducen la señal de PrP hasta el fondo. Se muestran triplicados. La Figura 1C muestra que ninguna de las dosis probadas de BFA fue tóxica para las células LD9. La viabilidad celular se midió usando el ensayo luminiscente - GLO® (Promega) por separado.

20 La Figura 2 es un gráfico que muestra el cribado de PrP en la superficie de las células LD9 vivas usando el ensayo de cribado de PrP descrito en el formato de 384 pocillos. DMSO es el disolvente usado en la mayoría de los bancos de cribado de moléculas pequeñas y se usará como control en las placas de cribado. Por lo tanto, Z' se calcula usando LD9 + DMSO como control para la señal de PrP más alta, LD9 + BFA como control para la señal de PrP más baja. El Z' del ensayo fue de 0,4, 0,6, 0,8 y -2,7 para  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$  y  $2 \times 10^4$  de células LD9, respectivamente. Cada punto se hizo por triplicado.

25 La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del examen preliminar de la Colección de Medicamentos de EE. UU. usando el ensayo de cribado primario. Solo se muestran los datos de los aciertos candidatos (seleccionados mediante el uso de una reducción del 50 % de la expresión de PrP de la superficie celular como umbral). Los paneles superiores muestran la expresión de PrP en la superficie de las células LD9 tras el tratamiento durante 24 horas con los compuestos indicados en el eje de abscisas. Los niveles de PrP se expresan como un porcentaje del control de DMSO. Cada placa de rastreo se muestra como un panel separado. El control de DMSO se muestra en púrpura para cada placa. El control de BFA redujo el valor de PrP de la superficie celular hasta el fondo (0 % de expresión de PrP). Z' fue de 0,7 para las cuatro placas. Los paneles inferiores muestran la viabilidad de las células LD9 tratadas con los compuestos durante 24 horas a la dosis de cribado. La viabilidad celular se midió mediante la presente contra-cribado como, por ejemplo, usando el kit CELLTITER-GLO. Nueve compuestos presentaron menos del 10 % de toxicidad y se seleccionaron como aciertos.

30 La Figura 4A a 4D muestran la reducción de PrP de la superficie celular mediante uno de los aciertos, Tacrolimus, confirmada mediante el cribado secundario en células N2a. PrP se marcó en la superficie de las células vivas a +4 °C con el anticuerpo monoclonal D18 y se fijó con PFA al 4 % antes de la adición del anticuerpo secundario marcado con Alexa-488. Figuras 4A, 4B: Análisis microscópico de células N2a tratadas con DMSO (imagen izquierda) y Tacrolimus (imagen derecha). La cuantificación se realizó mediante citometría de flujo (Figura 4C) y el analizador de células IN 1000 con el software Developer (Figura 4D). Leyenda de la Figura 4C: rojo: señal de PrP del control negativo (anticuerpo secundario solo); azul: señal de PrP para el control positivo (células tratadas con DMSO); verde y naranja: análisis duplicado de la señal de PrP para las células tratadas con Tacrolimus a las tres dosis diferentes indicadas en los paneles.

35 Las Figuras 5A a 5B son gráficos que muestran la reducción de PrP de la superficie celular por otros dos aciertos, Lasalocid sódico y Astemizol, confirmada mediante el cribado secundario en células N2a. El marcaje de PrP y la cuantificación del analizador de células IN se realizaron como se describe en las Figuras 4A-4D.

40 La Figura 6 muestra un ensayo secundario usado para priorizar los aciertos que reducen la expresión de PrP en la superficie celular. Los gráficos representan el número de células infectadas (detectadas como manchas por el ensayo de células de tembladera -SCA) en función del número de células. Líneas azules: células no tratadas; Líneas rojas: células tratadas con 1  $\mu\text{g/ml}$  de PIPLC (durante el tiempo indicado en cada panel). El valor de "RI<sub>200</sub>" se define como el recíproco del número de células requerido para dar 200 puntos. El RI<sub>200</sub> para el PK1 [RML] de control a las 26 horas es de  $3,3 \times 10^{-3}$  y para PK1 [RML] tratado con PIPLC es de  $5 \times 10^{-4}$ . Por lo tanto, PIPLC provocó una inhibición del 85 % de la infección ( $1 - [5 \times 10^{-4} / 3,3 \times 10^{-3}] \times 100$ ).

45 Las Figuras 7A y 7B ilustran que tacrolimus (Tac) y astemizol (Ast), dos compuestos seleccionados usando el procedimiento descrito en el presente documento que reducen las cantidades de PrP de la superficie celular como se muestra en las Figuras 4A-4D y 5A-5B, bloquean la infección de las células de neuroblastoma PK1 por RML y

priones 22L. Se trataron previamente células PK1 durante 3 días con las dosis indicadas de fármacos y se infectaron con RML (Figura 7A) o priones 22L (Figura 7B) usando una dilución  $10^{-4}$  de homogeneizado cerebral de un ratón infectado con RML o 22L. El tratamiento continuó durante 12 días después de la infección. Las células se analizaron mediante transferencia Western para detectar PrP<sup>Sc</sup> resistente a proteinasa K (una característica distintiva de la infección por priones) 9 y 18 días después de la infección (es decir, 3 días antes y 6 días después de la interrupción del tratamiento). Se usó PPS (polisulfato de pentosano), un fármaco que previene la infección por priones, a la dosis de 10 µg/ml como control positivo para la eficacia del tratamiento. CTRL: células no tratadas. Tanto el astemizol como el tracrolimus bloquearon la infección por priones, y no hubo rebote de la infectividad una vez cesado el tratamiento.

Las Figuras 8A-8E muestran la toxicidad de los oligómeros Aβ para células de neuroblastoma humano restringidas a las que expresan PrP. Figuras 8A, 8C: células no tratadas. Figuras 8B, 8D: células expuestas a oligómeros Aβ42 durante 4 días (100 µg/ml). En la Figura 8B, se observó vacuolación y pérdida celular. La Figura 8E es un análisis de transferencia Western por triplicado que muestra la expresión de PrP solo en células SK-NSH.

### **Descripción detallada**

Las realizaciones se dirigen a procedimientos para el cribado, la identificación y la cuantificación eficaces de muestras que contienen moléculas diana para su uso en ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS). En particular, los ensayos descritos en el presente documento no requieren etapas de lavado ni la unión de las moléculas diana a soportes sólidos. Así pues, las dianas se pueden analizar en condiciones en las que conservan su configuración *in vivo* natural. Se pueden identificar nuevos compuestos o nuevos usos de compuestos conocidos que afectan al nivel de una macromolécula celular.

La presente invención se describe con referencia a las figuras adjuntas, en la que se usan números de referencia similares en todas las figuras para designar elementos similares o equivalentes. Las figuras no están dibujadas a escala, y se proporcionan simplemente para ilustrar la presente invención. Varios aspectos de la invención se describen a continuación con referencia a las aplicaciones de ejemplo para ilustración. Debe entenderse que se establecen numerosos detalles específicos, relaciones y procedimientos para proporcionar una comprensión completa de la invención. Un experto en la materia pertinente, sin embargo, reconocerá fácilmente que la invención puede ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros procedimientos. La presente invención no está limitada por el orden ilustrado de actos o eventos, ya que algunos actos pueden ocurrir en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o eventos. Además, no todos los actos o eventos ilustrados son necesarios para implantar una metodología de acuerdo con la presente invención.

Las realizaciones de la invención pueden ponerse en práctica sin los aspectos teóricos presentados. Además, los aspectos teóricos se presentan con el entendimiento de que los solicitantes no buscan estar sujetos a la teoría presentada.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos (incluyendo los términos técnicos y científicos) usados en el presente documento tienen el mismo significado que un experto en la materia a la que la presente invención pertenece entiende comúnmente. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios de uso común, deben interpretarse con un significado que coincida con su significado en el contexto de la técnica pertinente, y no se interpretarán en un sentido idealizado ni demasiado formal a menos que así se defina expresamente en el presente documento.

### **Definiciones**

La terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir solamente realizaciones particulares y no se destina a ser limitante de la invención. Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" pretenden incluir también las formas en plural, salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se usen en la descripción detallada y/o las reivindicaciones, dichos términos pretenden ser inclusivos de una manera similar a la expresión "que comprende".

Como se usa en el presente documento, los términos "que comprende/n", "comprende/n" o "comprendido/s" y las variaciones de los mismos, en referencia a elementos definidos o descritos de un artículo, composición, aparato, procedimiento, proceso, sistema, etc. pretenden ser inclusivos o abiertos, permitiendo elementos adicionales, indicando así que el artículo, la composición, el aparato, el procedimiento, el proceso, el sistema, etc. definido o descrito incluye los elementos especificados, o, según sea apropiado, equivalentes de los mismos y que otros elementos pueden incluirse, y seguir estando dentro del ámbito/de la definición del elemento, composición, aparato, procedimiento, proceso, sistema, etc. definido.

La expresión "alrededor de" o el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor en particular según se determina por un experto en la materia, que dependerá, en parte, de cómo se mida o determine el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar más/menos 1 o más de 1 desviación típica, según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente, de hasta el 10 %, más preferentemente, hasta el 5 %,

y aún más preferentemente hasta el 1 % de un valor dado. Como alternativa, en particular, con respecto a los sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de una orden de magnitud, preferentemente 5 veces y más preferentemente 2 veces más, de un valor. Donde se describen los valores particulares en la solicitud y las reivindicaciones, salvo que se indique de otra manera debe asumirse que el término "aproximadamente" signifique dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Las expresiones "unión específica" o "que se une/n específicamente" cuando se usan en referencia a la interacción de una proteína y un anticuerpo o armazón proteico alternativo o peptido o aptámeros, significan que la interacción depende de la presencia de una determinada estructura (es decir, el determinante antigénico o epítipo) en la proteína; en otras palabras, el anticuerpo reconoce y se une a una estructura proteica específica en lugar de a proteínas en general. Así pues, un anticuerpo que "se une específicamente a" o que es "específico de" un determinado polipéptido o epítipo en un determinado polipéptido es aquel que se une a ese polipéptido o epítipo en particular en un polipéptido en particular sin unirse esencialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

El término "ligando" incluye cualquier compuesto, composición o molécula capaz de unirse específica o sustancialmente (es decir, con reactividad cruzada limitada) a otro compuesto o molécula, que, en el caso del reconocimiento inmunitario, contiene un epítipo. En muchos casos, los ligandos son anticuerpos, tales como anticuerpos policlonales o monoclonales. Los "ligandos" también incluyen derivados o análogos de anticuerpos, incluyendo, sin limitación: fragmentos Fv; fragmentos Fv monocatenarios (scFv); fragmentos Fab'; fragmentos F(ab')<sub>2</sub>; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos camelizados; y versiones multivalentes de los anteriores. También se pueden usar reactivos de unión multivalentes, según sea apropiado, incluyendo, sin limitación: anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos, tales como fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, tándem de scFv (fragmentos (scFv)), diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos, que normalmente son fragmentos scFv unidos covalentemente o estabilizados de otra manera (es decir, cremallera de leucina o fragmentos estabilizados por hélice). Los "ligandos" también incluyen peptoides, aptámeros peptídicos o de ácido nucleico, o miméticos de anticuerpos como DARPin, moléculas de anticuerpos, afininas, afinitinas, anticalinas, avímeros, finómeros, péptidos del dominio de Kunitz y monocuerpos.

Un "marcador" o un "marcador detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos o químicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen moléculas radiomarcadas de fluoróforos, compuestos luminiscentes, reactivos densos en electrones, enzimas (por ejemplo, como las usadas comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de un marcador en el péptido o usados para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

El término "fluoróforo" incluye cualquier compuesto, composición o molécula capaz de emitir luz en respuesta a la irradiación. En muchos casos, los fluoróforos emiten luz en la región visible de la luz. En otros casos, los fluoróforos pueden emitir luz en las regiones no visibles de la luz, tales como ultravioleta, ultravioleta cercano, infrarrojo cercano e infrarrojo. Por ejemplo y sin limitación, los ejemplos de fluoróforos incluyen: puntos cuánticos; nanopartículas; proteínas fluorescentes, tales como proteína fluorescente verde y proteína fluorescente amarilla; proteínas a base de hemo o derivados de las mismas; cromóforos basados en carbocianina, tales como IRDye 800CW, Cy 3 y Cy 5; cromóforos a base de cumarina, tales como (7-dietilamino-3-(4'-maleimidilfenil)-4-metilcumarina) (CPM); cromóforos a base de flúor, tales como la fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC); y numerosos cromóforos ALEXA FLUOR™ y bioconjugados ALEXA FLUOR™, que absorben en los espectros visible e infrarrojo cercano. La emisión de los fluoróforos se puede detectar por cualquier número de procedimientos, que incluyen, pero sin limitación, espectroscopía de fluorescencia, microscopía de fluorescencia, fluorímetros, lectores de placas fluorescentes, análisis de escáner infrarrojo, microscopía confocal de barrido láser, nanoscopía confocal automática de barrido, espectrofotómetros láser, clasificadores de células activadas por fluorescencia (FACS), analizadores basados en imágenes y escáneres fluorescentes (por ejemplo, escáneres de gel/membrana).

Como se usa en el presente documento, el término "cromóforo" se refiere a un sustituyente que, con otro cromóforo, puede usarse para la transferencia de energía (por ejemplo, ensayo FRET).

La expresión "compuesto quimioluminiscente" incluye cualquier compuesto, composición o molécula capaz de emitir luz en respuesta a una reacción química. Un "compuesto bioluminiscente" se refiere a una forma natural de un compuesto quimioluminiscente. Los ejemplos de compuestos quimioluminiscentes incluyen: lucigenina, luminol. Los ejemplos de compuestos bioluminiscentes incluyen: luciferinas, coelenterazinas. La emisión de compuestos quimioluminiscentes puede ser detectada mediante luminómetros o espectrómetros de barrido.

La expresión "componente luminiscente" o "compuesto luminiscente" como se usa en el presente documento se refiere a un componente capaz de absorber energía, tal como energía eléctrica (por ejemplo, electroluminiscencia), química (por ejemplo, quimioluminiscencia) o acústica, y luego emitir al menos una fracción de esa energía en forma de luz a lo largo del tiempo. El término "componente" como se usa en el presente documento incluye compuestos diferenciados, moléculas, proteínas bioluminiscentes y complejos macromoleculares, o mezclas de compuestos luminiscentes y no luminiscentes o moléculas que actúan para producir la emisión de luz.

Como se usa en el presente documento, las "muestras biológicas" incluyen muestras sólidas y de fluidos corporales.

Las muestras biológicas usadas en la presente invención pueden incluir células, proteínas o extractos de membrana de células, sangre o fluidos biológicos, tales como líquido ascítico o líquido cerebral (por ejemplo, líquido cefalorraquídeo). Los ejemplos de muestras biológicas sólidas incluyen, pero sin limitación, muestras tomadas de tejidos del sistema nervioso central, hueso, mama, riñón, cuello del útero, endometrio, cabeza/cuello, vesícula biliar, glándula parótida, próstata, glándula pituitaria, músculo, esófago, estómago, intestino delgado, colon, hígado, bazo, páncreas, tiroides, corazón, pulmón, vejiga, tejido adiposo, ganglio linfático, útero, ovario, glándulas suprarrenales, testículos, amígdalas, timo y piel, o muestras tomadas de tumores. Los ejemplos de "muestras de fluidos corporales" incluyen, pero sin limitación, sangre, suero, semen, líquido prostático, líquido seminal, orina, heces, saliva, esputo, moco, médula ósea, linfa y lágrimas.

La expresión "cribado de alto rendimiento" o "HTS" se refiere a un procedimiento basado en diferentes tecnologías y disciplinas, por ejemplo, óptica, química, biología o análisis de imágenes para permitir una rápida investigación biológica altamente paralela y el descubrimiento de fármacos. Los procedimientos de HTS son conocidos en la técnica y, en general, se realizan en placas de múltiples pocillos con equipos automáticos de manejo y cribado de líquidos; sin embargo, se prevé que los procedimientos de la invención se pueden poner en práctica en una micromatriz o en un sistema microfluídico.

El término "banco" o la expresión "banco de fármacos", como se usa en el presente documento, se refiere a una pluralidad de moléculas químicas (compuesto de prueba), una pluralidad de ácidos nucleicos, una pluralidad de péptidos o una pluralidad de proteínas, compuestos orgánicos o inorgánicos, moléculas sintéticas, moléculas naturales o combinaciones de las mismas.

Como se usa en el presente documento, el término "diana" o la expresión "molécula diana" se refiere a cualquier tipo de molécula o estructura que se vaya a detectar o caracterizar. La molécula puede ser una molécula intracelular, tal como, por ejemplo, secuencias de ácidos nucleicos, péptidos, estructuras (por ejemplo, membranas intracelulares, ribosomas, etc.), moléculas de superficie (por ejemplo, receptores), moléculas extracelulares (por ejemplo, citocinas, enzimas, partículas víricas y similares).

Como se usa en el presente documento, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de administración para administrar materiales. En el contexto de los ensayos de reacción, dichos sistemas de administración incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, el transporte o la administración de los reactivos de reacción (por ejemplo, oligonucleótidos, enzimas, etc. en los recipientes adecuados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones por escrito para realizar el ensayo, etc.) de un sitio a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recipientes (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte más importantes. Como se usa en el presente documento, la expresión "kit fragmentado" se refiere a sistemas de administración que comprenden dos o más recipientes separados, donde cada uno contiene una subparte de la totalidad de los componentes del kit. Los recipientes se pueden suministrar al recipiente previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene oligonucleótidos. La expresión "kit fragmentado" pretende abarcar kits que contienen reactivos específicos de analito (ASR) regulados de conformidad al artículo 520(e) de la ley federal estadounidense de alimentos, fármacos y productos cosméticos [Federal Food, Drug, and Cosmetic Act, pero sin limitación. De hecho, cualquier sistema de administración que comprenda dos o más recipientes separados, en el que cada uno contenga una subparte de la totalidad de los componentes del kit, está incluida en la expresión "kit fragmentado". Por el contrario, un "kit combinado" se refiere a un sistema de administración que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un solo recipiente (por ejemplo, en una sola caja que aloja cada uno de los componentes deseados). El término "kit" incluye tanto kits fragmentados como kits combinados.

#### *Descripción del ensayo.*

En una realización preferida, se coloca en un recipiente la muestra que contiene la proteína o la molécula deseada para el cribado (la "diana"). En una realización, la diana es una molécula conocida, por ejemplo, cuando el cribado se realiza para una molécula en particular para el diagnóstico de una enfermedad o de un trastorno, o identifica sujetos que pueden estar en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno, o cuando el cribado es para un compuesto que modificará la cantidad de una molécula asociada a la enfermedad.

Se proporciona un ejemplo del ensayo, que debe ser ilustrativo y no debe interpretarse como limitante. Por ejemplo, el primer ligando, que está unido al fluoróforo donante, y el segundo ligando, que está unido al fluoróforo aceptor, se añaden al receptáculo. Cada uno de los ligandos se une a un sitio específico y distinto de la misma molécula diana. La muestra que contiene la diana unida a los ligandos se irradia a una longitud de onda óptima para excitar el fluoróforo donante. Se mide la intensidad de la luz emitida por el fluoróforo aceptor como resultado de su excitación por la energía transferida desde el fluoróforo donante (Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET)). La distancia entre el fluoróforo donante y el fluoróforo aceptor se define como igual o inferior a la distancia definida por el radio de Förster.

Las muestras se pueden identificar y/o cuantificar mediante cualquier procedimiento útil de detección de fluorescencia, tal como mediante fluorímetros, fluorímetros con resolución temporal, microscopía fluorescente, lectores de placas fluorescentes, análisis de escáner infrarrojo, espectrofotómetros, clasificadores de células activadas por fluorescencia (FACS) y escáneres fluorescentes (por ejemplo, escáneres de gel/membrana). Aunque las muestras se pueden

analizar con un microscopio confocal de barrido láser, un nanoscopio confocal automático o un espectrofluorímetro de microplaca, el procedimiento se puede adaptar fácilmente a otros dispositivos (por ejemplo, clasificador de células FACS) para aplicaciones en otros campos. La FRET se puede detectar directa o indirectamente. La detección directa de la FRET se realiza excitando al donante (CPM) y detectando la señal emitida por el aceptador (FITC o Alexa488).  
 5 Como se usa en el presente documento, el término "señal" significa cualquier evento detectable (ya sea directo o indirecto) indicativo de FRET, e incluye sin limitación, emisión de un fotón. La FRET se detecta indirectamente usando el procedimiento descrito por Karpova y colaboradores (T. S. Karpova y col., *J Microsc* 209, 56-70, 2003).

El término "ensayo" usado en el presente documento, ya sea en singular o en plural no se interpretará mal ni se limitará a estar dirigido a un solo ensayo con etapas específicas, sino que también incluirá, sin limitación, cualquier etapa  
 10 adicional, materiales, varias iteraciones, alternativas, etc., que también se podrán usar. Así pues, si el término "ensayo" se usa en singular, es meramente con fines ilustrativos.

En una realización preferida, el ensayo omite el lavado entre etapas. En un aspecto, las etapas de lavado se omiten antes y/o después de la adición de los ligandos a los receptáculos. El inconveniente de los ensayos disponibles en la actualidad es que el requisito de que la diana esté firmemente unida a un soporte plantea dos problemas principales:  
 15 (a) la unión puede ser incompleta, la eficacia de la unión puede ser diferente para distintas configuraciones o formas de la diana, o la unión de la diana al soporte puede enmascarar en un grado desconocido la accesibilidad del sitio para ser reconocido por el anticuerpo primario. (b) El requisito de que el exceso de anticuerpo (tanto secundario como primario) se elimine lo más completamente posible requiere lavados repetidos, lo que es laborioso y consume mucho tiempo, y, en algunos casos, no es factible. En particular, en los ensayos de alto rendimiento, en los que se analizan  
 20 cientos de miles de muestras de tensor en 384 o 1.536 placas de pocillos, no se pueden implementar procedimientos de lavado.

Los ensayos realizados en el presente documento, evitan la necesidad de fijar la diana a un soporte y de una etapa de lavado. En una realización, el ensayo emplea la transferencia de energía de resonancia de Förster o FRET, un  
 25 procedimiento en el que un fluoróforo ("donante") puede ser excitado por la luz y puede transferir la excitación a un segundo fluoróforo ("aceptor") si y solo si están lo suficientemente cerca, es decir, dentro de una distancia del orden de 100 Å o inferior, definida por el radio de Förster. A continuación, se proporcionan más detalles sobre los ensayos de FRET. Aunque la FRET se usa como un ejemplo ilustrativo, los ensayos descritos en el presente documento no se limitan a ensayos a base de FRET. Por ejemplo, un ensayo que usa una proteína bioluminiscente, tal como la luciferasa, para excitar un fluoróforo proximal (BRET), normalmente, una proteína fluorescente (Xu y col. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96(1), 151-6). Otra alternativa de ensayo es una química luminiscente de canalización de oxígeno (Ullman y col. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 91(12), 5426-30), en el que un sistema generador de oxígeno singlete inducido por la luz transfiere el oxígeno singlete a un sistema quimioluminiscente cercano.

En una realización, los fluoróforos donantes y aceptores (marcador detectable/moléculas detectables) están unidos a dos ligandos distintos, por ejemplo, anticuerpos que pueden unirse específicamente a sitios distintos de una misma  
 35 diana. Cuando los ligandos que portan el donante y el fluoróforo aceptor, respectivamente, se unen a la misma molécula diana, y al hacerlo, se acercan lo suficiente, la irradiación de la muestra a una longitud de onda que permite la excitación del donante produce la emisión de radiación por el aceptor. Los ligandos que no están unidos a la misma diana no dan lugar a la FRET y, por lo tanto, no necesitan eliminarse antes de la medición de la radiación emitida. Como la diana no está adsorbida ni unida a un soporte, está totalmente disponible para la interacción con los ligandos.

En una realización, Un procedimiento de identificación y cuantificación de una molécula diana específica en una muestra comprende el cribado de una muestra que contiene la molécula diana específica en un ensayo de cribado de alto rendimiento que comprende las etapas de: (i) añadir un primer y un segundo ligando, teniendo cada uno un primer y un segundo marcador detectable, (ii) unir el primer y el segundo ligando a sitios separados y específicos de una molécula diana específica, en el que el ensayo de cribado omite la etapa de (iii) lavar y detectar una emisión de luz  
 40 cuando el primer y el segundo ligando se unen específicamente a la molécula diana específica. Preferentemente, el marcador detectable comprende: fluoróforos, moléculas luminiscentes, enzimas o radionucleidos. En algunas realizaciones, la luz comprende: fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia.

En algunas realizaciones, el ensayo es un análisis de cribado de alto rendimiento en el que el ensayo de cribado de alto rendimiento comprende un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) o de polarización de fluorescencia.  
 50

En una realización, los ligandos comprenden: polipéptidos tales como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos portadores de sitios de reconocimiento de epítopos, tales como Fab, Fab', fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, miméticos de anticuerpos (tales como DARPin, moléculas de anticuerpos, afinas, aftinas, anticualinas, avimeros, finómeros, péptidos del dominio de Kunitz y monocuerpos), peptoides, aptámeros y similares.  
 55 En una realización, el primer y el segundo ligando son el mismo tipo de molécula. En otra realización, el primer y el segundo ligando son diferentes tipos de moléculas. En algunas realizaciones, el primer o el segundo ligando comprenden: anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, fragmentos Fv; fragmentos Fv monocatenarios (scFv); fragmentos Fab'; fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos camelizados, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos, anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos, fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, tándem de scFv (fragmentos (scFv)), diacuerpos, tricuerpos  
 60

o tetracuerpos, peptoides, aptámeros de péptido o de ácido nucleico, miméticos de anticuerpos o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el primer y el segundo ligando comprenden: un polipéptido, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, miméticos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, ácidos nucleicos, un aptámero, un peptoide o una fracción de azúcar, o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el primer y el segundo ligando son aptámeros de péptido o de ácido nucleico. En otras realizaciones, el primer y el segundo ligando son fracciones de azúcar que comprenden glicosaminoglicanos, sulfatos de heparán o sulfatos de condroitina.

En algunas realizaciones, los procedimientos se usan para identificar y cuantificar una molécula específica en una muestra. En dichas realizaciones, un procedimiento de cuantificación de una molécula específica, por ejemplo, una proteína en una muestra, el procedimiento comprende las etapas de: colocar la muestra que contiene la molécula diana específica en un receptáculo que permita la irradiación de la muestra a una longitud de onda adecuada para excitar el fluoróforo donante y medir la fluorescencia del fluoróforo aceptor mediante un ensayo de alto rendimiento; añadir un primer ligando que se une a un sitio específico de la molécula diana, en el que el primer ligando está unido a un primer fluoróforo (el "fluoróforo donante"); añadir un segundo ligando que se une a un sitio específico de la misma molécula diana distinta de aquella a la que se une el primer ligando, en el que el segundo ligando se une a un segundo fluoróforo (el "fluoróforo aceptor"); omitiendo las etapas de lavado entre cada etapa; irradiar la muestra que contiene la molécula diana unida a los ligandos a una longitud de onda óptima para excitar el fluoróforo donante y medir la intensidad de la luz emitida por el fluoróforo aceptor.

En una realización, la intensidad de la luz emitida se mide mediante fluorimetría de resolución temporal. En algunas realizaciones, la excitación se transfiere al fluoróforo aceptor cuando el fluoróforo donante está a una distancia del fluoróforo aceptor que es igual o inferior a la distancia definida por el radio de Förster.

En algunas realizaciones, la diana está presente en una muestra que comprende: un líquido, un semilíquido, un gel, una muestra biológica, una celda intacta, una célula permeabilizada, una célula interrumpida, un homogeneizado celular, una membrana o un orgánulo celular.

En otras realizaciones, los ligandos se unen a un marcador detectable (molécula detectable), ya sea directamente o a través de un enlazador adecuado. La presente invención no se limita a un grupo enlazador en particular. De hecho, se contempla una variedad de grupos enlazadores, y los enlazadores adecuados podrían comprender, pero sin limitación, grupos alquilo, éter, poliéter, enlazador de alquilamida, un enlazador peptídico, un enlazador polipeptídico, un enlazador peptídico o polipeptídico modificado, un ácido nucleico peptídico (PNA), un enlazador de poli(etilenglicol) (PEG), un enlazador de estreptavidina-biotina o de avidina-biotina, poliaminoácidos (por ejemplo, polilisina), PEG funcionalizado, polisacáridos, glicosaminoglicanos, polímeros dendríticos, polímeros quelantes de PEG, enlazador oligonucleotídico, derivados de fosfolípido, cadenas de alquenilo, cadenas de alquinilo, disulfuro, o una combinación de los mismos.

En otra realización preferida, el marcador detectable se une al ligando, a través de un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlace iónico, de Van der Waals, electrostático o de hidrógeno.

Hay diferentes procedimientos que un experto en la materia puede poner en práctica para identificar diferentes ligandos o combinaciones de ligandos. En un ejemplo, se llevó a cabo un mejor análisis de pares de ligandos como se describe en el apartado de "Ejemplos" que figura a continuación. En resumen, para seleccionar los mejores compuestos de los aciertos generados durante el cribado primario, se puede usar la siguiente estrategia: (1). Selección de los compuestos que ejercen el mayor efecto. (2). Selección de los compuestos que ejercen el efecto a la concentración más baja y que albergan la menor toxicidad en las células. Con este fin, se pueden determinar la  $CE_{50}$  y la  $CT_{50}$  mediante cualquiera de los ensayos usados habitualmente por los expertos en la materia. (3). Selección de los compuestos que presentan la mayor especificidad hacia una molécula. Aunque no se requiere una especificidad completa para que un compuesto alcance un buen índice terapéutico, esto se puede usar como criterio para la selección de compuestos. (4). Se puede determinar la selección de los compuestos que muestran la mayor propiedad deseada o capacidad terapéutica. La "capacidad terapéutica" (o "tratamiento") depende de la afección que se deba tratar. Por ejemplo, un compuesto antivírico inhibiría una infección vírica mediante la inhibición de la replicación, ralentizando el crecimiento del virus, etc. Se puede usar cualquier parámetro de producción deseado. Un "efecto" sería el tipo de parámetro para el que un experto en la materia está cribando los compuestos. Esto incluye, por ejemplo, la actividad, la función, la expresión etc., de la molécula diana. Así pues, por ejemplo, si un experto en la materia está cribando compuestos por un efecto inhibidor sobre una determinada molécula diana, entonces los parámetros usados pueden ser perfiles de expresión si la molécula diana es un péptido de ácido nucleico, etc. En otros casos puede ser la actividad, por ejemplo, si es una enzima. En otros casos, puede ser un receptor, y el efecto medido sería la modulación de la señalización, la expresión superficial o el cambio de configuración. En otros casos, el compuesto de prueba, o un agente terapéutico candidato, puede tener un efecto sobre la formación o las propiedades (por ejemplo, configuración o afinidad de unión) entre la molécula diana y su pareja de unión. En otros casos, el compuesto o agente de prueba puede tener un efecto en la estructura secundaria o terciaria de la molécula diana. En otros casos, el agente de prueba puede inhibir la función de la molécula diana. Así pues, los efectos medidos estarían limitados solo por la imaginación del usuario.

En ciertas realizaciones, en el presente documento, se proporcionan procedimientos de identificación de los efectos de un compuesto que modula una molécula diana, que comprenden: (a) proporcionar una molécula diana marcada con un primer cromóforo en una primera posición; (b) excitar el cromóforo; y (c) medir la vida útil de fluorescencia del



primer cromóforo; en el que una diferencia entre la vida útil de fluorescencia en presencia del compuesto de prueba y la vida útil de fluorescencia en ausencia del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba modula la molécula diana, de modo que se altera la vida útil de fluorescencia del cromóforo. En una realización, la molécula diana se marca además con un segundo cromóforo en una segunda posición, siendo la segunda posición diferente de la primera posición, y pudiéndose usar los cromóforos para la transferencia de energía.

En ciertas realizaciones, en el presente documento, se proporcionan procedimientos de identificación de los efectos de un compuesto que modula una molécula diana, que comprenden: (a) proporcionar una molécula diana marcada con un primer cromóforo en una primera posición y un segundo cromóforo en una segunda posición, siendo la segunda posición diferente de la primera posición, y pudiéndose usar el primer y el segundo cromóforos para la transferencia de energía; (b) excitar el primer o el segundo cromóforo; y (c) medir la FRET entre los cromóforos; en el que una diferencia entre la FRET en presencia del compuesto de prueba y la FRET en ausencia del compuesto de prueba indica que el compuesto de prueba produce el efecto deseado, de manera que se altera la transferencia de energía entre los dos cromóforos.

En otra realización preferida, los ligandos se unen covalentemente, se enlazan, se unen por fusión o de otro modo en contacto con un fluoróforo donante o aceptor adecuado.

En otra realización preferida, el tipo de molécula diana que se puede analizar no está limitado por su forma, su estructura ni el medio en el que se analiza. Por ejemplo, la molécula diana puede ser o estar: libre en solución, parte de una célula intacta, una célula permeabilizada, una célula interrumpida, un homogeneizado celular, una membrana, un orgánulo celular, unida a perlas, enlazada o unida a nanopartículas, lípidos, columnas, polímeros, plástico, vidrio y similares. En algunos aspectos, la muestra flota libremente y no está adherida a la superficie de la cubeta o del receptáculo. Los ejemplos de tipos de moléculas incluyen, sin limitación: una proteína, un péptido, un polipéptido, un ácido nucleico, un polinucleótido, un oligonucleótido, un ácido nucleico peptídico, una glicoproteína, un carbohidrato, una molécula orgánica o inorgánica, una molécula natural aislada, una molécula sintética, moléculas pequeñas, o combinaciones de las mismas.

En otras realizaciones, la molécula diana puede unirse a un lípido o a una membrana celular. Los lípidos adecuados para los procedimientos y kits proporcionados en el presente documento pueden ser cualquier lípido o una combinación de los mismos en diversas proporciones capaces de formar una membrana conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, los lípidos son de origen natural. En ciertas realizaciones, los lípidos son sintéticos. En ciertas realizaciones, los lípidos son uno o más de entre acilos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, sacarolípidos, policétidos, lípidos de esteroides, lípidos de prenol y un derivado de los mismos. En ciertas realizaciones, los lípidos son uno o más lípidos a base de colina (por ejemplo, fosfatidilcolina (PC)), lípidos a base de etanolamina (por ejemplo, fosfatidiletanolamina (PE)), lípidos a base de serina (por ejemplo, fosfatidilserina), lípidos a base de glicerol (por ejemplo, fosfatidilglicerol), lípidos a base de colesterol, dolicoles, esfingolípidos (por ejemplo, esfingosina, gangliósidos o fitosfingosina), lípidos a base de inositol (por ejemplo, fosfatidilinositol), cardiolipina, ácido fosfatídico, lisofosfatidas (por ejemplo, lisofosfatidas), fosfolípidos hidrogenados y un derivado de los mismos.

En ciertas realizaciones, los lípidos son un o más de entre PC, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), palmitoil-oleoilfosfatidilcolina (POPC), éster de 2-dioleoil-3-succinil-sn-glicerol-colina (DOSC), PE, dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), esfingomielina (SM), dodecilsulfato de sodio (SDS), colesterol (CHOL), hemisuccinato de colesterol (CHEMS), colesterol-(3-imidazol-1-il propil)carbamato (CHIM), hemisuccinato de diacilglicerol (DG-Succ), sulfato de colesterol (Chol-SO<sub>4</sub>), bromuro de dimetildiodecilonio (DDAB), ácido dioleoilfosfatídico (DOPA), Cloruro de 1,2-dioleoiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DORI), 11,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), cloruro de *N*-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-*N,N,N*-trietilamonio (DOTMA), bromuro de 1,2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), cloruro de *N,N*-dioleil-*N,N*-dimetilamonio (DODAC), bromuro de 1,2-dioleoil-3-dimetil-hidroxietilamonio (DORIE), trifluoroacetato de *N*-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-*N*-(2-(esperminacarboxamido)etil)-*N,N,N*-dimetilamonio (DOSPA), cloruro de 1-(2-(oleiloxi)etil)-2-oleil-3-(2-hidroxietil)imidazolinio (DOTIM), cloruro de *N*-(trimetilamonioacetil)-didodecil-D-glutamato (TMAG), bromuro de *N,N*-di-*n*-hexadecil-*N,N*-dihidroxietilamonio (DHMHAC), cloruro de *N,N*-di-*n*-hexadecil-*N*-metil-*N*-(2-hidroxietil)amonio (DHDEAB), cloruro de *N,N*-miristoil-*N*-(1-hidroxiprop-2-il)-*N*-metilamonio (DMHMAC), 1,2-dioleoil-3-(4'-trimetilamonio)butanoil-sn-glicerol (DOTB), anfífilos sintéticos interdisciplinarios (lípidos SAINT), 4-(2,3-bis-aciloxipropil)-1-metil-1*H*-imidazol (DOIM), 2,3-bis-palmitoil-propil-piridin-4-il-amina (DPAPy), 3.beta-(*N*-(*N*9,*N*9-trimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (DC-Col), 3.beta-(*N*-(*N*9,*N*9-trimetilaminoetano)carbamoil)colesterol (TC-Chol), 3.beta-(*N*-(*N,N'*-dimetilaminoetan)-carbamoil)colesterol (DAC-Chol), bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), cardiolipinas catiónicas (por ejemplo, (1,3-bis-(bromuro de 1,2-bis-tetradeciloxipropil-3-dimetiletioxiamonio)-*p*-ropano-2-ol) (NEOPHECTIN™), hemisuccinato de *N*-histidinil-colesterol (HistChol), hemisuccinato de 4-(2-aminoetil)-morfolino-colesterol (MoChol), hemisuccinato de histaminil-colesterol (HisChol) y un derivado de los mismos.

Los disolventes adecuados para los procedimientos y kits proporcionados en el presente documento pueden ser cualquier disolvente capaz de facilitar la solubilización de lípidos conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, el disolvente es uno o más de metanol, etanol, acetonitrilo y cloroformo. En una realización, el disolvente es metanol. En

otra realización, el disolvente es etanol. En otra realización más, el disolvente es acetonitrilo. En otra realización más, el disolvente es cloroformo. En ciertas realizaciones, el disolvente es una solución acuosa que comprende uno o más detergentes anfífilos. Los ejemplos de dichos detergentes incluyen, pero sin limitación, oxilglucósido, monododecileter de octaetilenglicol (C<sub>12</sub>E<sub>8</sub>), dodecilsulfocolina y desoxicolato.

5 *Moléculas diana*: A continuación, se muestra una lista no exhaustiva de macromoléculas celulares que representan dianas terapéuticas (también denominadas en el presente documento "moléculas diana") para el descubrimiento de fármacos de HTS usando los procedimientos descritos en el presente documento. Los dianas cumplen el criterio de que la modulación de sus cantidades tendrá un efecto terapéutico en el contexto de una enfermedad en particular, y que no son esenciales para el hospedador, o que su cantidad se puede disminuir o aumentar sin dañar al hospedador. 10 Los ejemplos incluyen, sin limitación: proteína precursora de amiloide (APP), la proteína que es un precursor de los agregados tóxicos de A $\beta$  encontrados en la enfermedad de Alzheimer; APP mutada responsable de la enfermedad de Alzheimer familiar; BACE-1, la enzima de escisión de APP del sitio  $\beta$ , que es una de las dos enzimas que conducen a la formación de agregados tóxicos de A $\beta$ ; Tau, otra proteína tóxica clave implicada en la patología de la enfermedad de Alzheimer y las formas hereditarias de demencia frontotemporal;  $\alpha$ -sinucleína, que, cuando se sobreexpresa y/o se 15 agrega, causa la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades conocidas colectivamente como sinucleinopatías; SOD1 mutada responsable de la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELA); huntingtina mutada responsable de la enfermedad de Huntington, un trastorno neurológico hereditario; receptores o correceptores víricos tales como el correceptor del VIH CCR5, que ha demostrado no ser funcional en seres humanos protegidos de manera natural contra la infección por VIH; marcadores de células tumorales que están relacionadas con la invasividad tumoral y el potencial metastásico; receptor de insulina, cuya regulación a la baja causa diabetes de tipo II; receptores de citocinas o quimiocinas; enzimas de la vía ubiquitina; marcadores enzimáticos y similares.

En algunas realizaciones, las moléculas diana deseadas son ácidos nucleicos, primero se usan secuencias diana candidatas para buscar en varias bases de datos que catalogan, por ejemplo, SNP, secuencias que regulan la expresión o función de un producto codificado y similares. Las bases de datos específicas incluyen dbSNP del NCBI, 25 la base de datos de SNP HGBASE del RU, la base de datos SNP Consortium y la base de datos DE SNP del Japanese Millenium Project.

En algunas realizaciones, tras las búsquedas en dbSNP, se busca en las bases de datos de locus génicos (por ejemplo, Locus Link). LocusLink proporciona una interfaz de consulta única para secuencia curada e información 30 descriptiva sobre locus génico. Presenta información sobre la nomenclatura oficial, alias, accesos de secuencias, fenotipos, números CE, números MIM, grupos UniGene, homología, ubicaciones cartográficas, dominios de proteínas y sitios web relacionados. La información procedente de LocusLink incluye un número de acceso de LocusLink (LocusID), un número de cóntigo genómico del NCBI (n.º NT), un número de referencia de ARNm (n.º NM), variantes del sitio de corte y empalme del ARNm de referencia (n.º XM), un número de proteína de referencia (n.º NP), un número de acceso de OMIM y un número de acceso de Unigene (n.º HS).

35 En otras realizaciones, se puede buscar en bases de datos de asociación de enfermedades para identificar moléculas diana candidatas. Tras la búsqueda en LocusLink, la información devuelta se usa para buscar en bases de datos de asociación de enfermedades. En algunas realizaciones, La búsqueda se realiza en la iniciativa de base de datos de mutaciones HUGO, que contiene una colección de enlaces a bases de datos de SNP/mutaciones para enfermedades o genes específicos.

40 En algunas realizaciones, la búsqueda se realiza en la base de datos OMIM. OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) es un catálogo de genes humanos y trastornos genéticos desarrollado para la red informática mundial (WWW) por el NCBI, el Centro Nacional de Información Biotecnológica. La base de datos contiene información textual y referencias. Los resultados de la OMIM incluyen un número de acceso modificado en el que múltiples SNP están asociados con un trastorno genético. El número se anota para designar la presencia de múltiples SNP asociados con 45 el trastorno genético.

En algunas realizaciones, tras las búsquedas en dbSNP, se usa el software (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, UniGene) para dividir los resultados de la búsqueda en grupos orientados a genes (por ejemplo, análisis de grupos orientados a genes). UniGene es un sistema para dividir automáticamente secuencias del GenBank en un conjunto no redundante de grupos orientados a genes. Cada grupo de UniGene contiene secuencias que representan 50 un único gen, así como información relacionada, tal como los tipos de tejido en los que se ha expresado el gen y la ubicación cartográfica. Además de las secuencias de genes bien caracterizados, se incluyen cientos de miles de nuevas secuencias de marcador de secuencia expresada (EST) en UniGene. En la actualidad, se han procesado secuencias de ser humano, rata, ratón, pez cebra y vaca.

En algunas realizaciones, las secuencias diana se usan para buscar en bases de datos de genomas (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, la base de datos Golden Path de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC) y el GenBank). La base de datos Golden Path se explora a través de BLAST usando la secuencia en formato FASTA o usando el n.º RS obtenido de dbSNP. El GenBank se explora a través de BLAST usando la secuencia enmascarada en formato FASTA. En algunas realizaciones, las búsquedas en GoldenPath y GenBank se realizan simultáneamente con las búsquedas en TSC y dbSNP. En algunas realizaciones, las búsquedas dan lugar a la identificación del gen 60 correspondiente. Los resultados de la GenBank incluyen un número de acceso del GenBank. Los resultados de ambas

bases de datos incluyen números de acceso de cóntigo. Así pues, hay muchas maneras en las que un experto en la materia puede identificar una posible diana, además de la molécula diana deseada por el usuario.

Se pueden seleccionar otras moléculas diana, por ejemplo, en terapias basadas en hormonas esteroides. En dichos casos, por ejemplo, la sulfatación, engloba la participación en la regulación del nivel de estrógenos en tumores mamarios, así como los niveles de andrógenos en los tumores de próstata. La disponibilidad de ensayos de HTS robustos para la sulfatación de esteroides puede proporcionar una adición importante al arsenal de herramientas moleculares disponibles para los grupos farmacéuticos centrados en la transducción de señales de esteroides.

La modulación de los neuroesteroides se está investigando como un nuevo enfoque farmacológico para controlar el equilibrio excitador neuronal (Malayev, A., y col., *Br J Pharmacol*, 2002, 135:901-9; Maurice, T., y col., *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 37:116-32; Park-Chung, M., y col., *Brain Res*, 1999, 830:72-87). Los procedimientos englobados por la presente invención pueden acelerar adecuadamente estos esfuerzos al permitir el cribado fácil de neuroesteroides endógenos y sintéticos para la sulfoconjugación, ofreciendo información sobre la biología fundamental y proporcionando una herramienta para la identificación y optimización de moléculas precursoras. La necesidad de mejores herramientas moleculares se acentúa por el hecho de que ya existe un mercado de venta libre considerable para DHEA como un suplemento dietético "antienvjecimiento" destinado a aliviar la senilidad relacionada con la edad y la pérdida de memoria (Salek, F. S., y col., *J Clin Pharmacol*, 2002, 42).

En otro ejemplo, los procedimientos incorporados en la presente invención pueden identificar adecuadamente las dianas farmacológicas con respecto al sulfato de colesterol en la regulación del flujo de colesterol, la agregación plaquetaria y el desarrollo de la piel en tratamientos para enfermedades cardiovasculares y, quizás, para algunas formas de cáncer de piel. En este caso, una sulfotransferasa podría convertirse en la diana farmacológica, y es posible que sea necesario identificar las moléculas que inhiben selectivamente esta isoforma.

En otro ejemplo, una molécula diana puede ser un metabolismo de fármaco implicado. Los problemas del metabolismo de los fármacos, tales como la producción de metabolitos tóxicos y la farmacocinética desfavorable, producen casi la mitad de todos los fracasos de los candidatos a fármacos durante los ensayos clínicos. Todas las principales compañías farmacéuticas han reconocido la necesidad de considerar las consecuencias farmacocinéticas y farmacogenómicas al inicio del procedimiento de descubrimiento de fármacos, lo que genera una necesidad inmediata de procedimientos *in vitro* de alto rendimiento para evaluar el metabolismo de los fármacos. Aparte de la oxidación dependiente de P450, la glucuronidación es quizás la vía más importante del metabolismo hepático de los fármacos. La glucuronidación elimina o activa un amplio espectro de fármacos, incluyendo los fármacos antiinflamatorios no esteroideos, opioides, antihistamínicos, antipsicóticos y antidepresivos (Meech, R. y Mackenzie, P. I., *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1997, 24:907-15; Radominska-Pandya, A., y col., *Drug Metab Rev*, 1999, 31:817-99). A pesar de su importancia, la especificidad del sustrato amplia y solapante de las UDP-glucuronosiltransferasas hepáticas (UGT) que catalizan la glucuronidación sigue siendo poco conocida debido a la falta de procedimientos de ensayo *in vitro* flexibles.

En otro ejemplo, la molécula diana puede ser una proteína quinasa o un sustrato de la misma. Hay más de 400 quinasas distintas codificadas en el genoma humano; dilucidar su papel en la enfermedad e identificar inhibidores selectivos es una importante iniciativa farmacéutica. El mal funcionamiento de la quinasa se ha relacionado con todas las áreas terapéuticas más importantes, incluyendo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, inflamación, enfermedades neurodegenerativas y trastornos metabólicos. Además, la validación clínica de las quinasas como dianas farmacológicas se ha demostrado recientemente en los casos de Herceptin y Gleevec, que inhiben las tirosina quinasas aberrantes que contribuyen al cáncer de mama y a la leucemia, respectivamente. Las realizaciones de los procedimientos acelerarán los esfuerzos para definir la especificidad del sustrato de quinasa e identificar nuevos inhibidores al proporcionar un ensayo catalítico universal que puede usarse con cualquier quinasa y cualquier sustrato aceptor.

Las proteínas quinasas son una gran familia diversa con un papel clave en la transducción de señales. Las proteínas quinasas, que catalizan la transferencia del grupo fosfato terminal de ATP o GTP a restos de serina, treonina o tirosina de proteínas aceptoras, son una de las mayores familias de proteínas del genoma humano. En el sentido más amplio, se pueden dividir en serina/treonina o tirosina quinasas y enzimas solubles o receptores transmembrana. En el análisis genómico más reciente y exhaustivo, se identificaron 428 quinasas humanas que comprenden ocho grupos de homología diferentes, que también reflejan diferencias en la especificidad del sustrato, estructura/ubicación y/o modo de regulación (Hanks, S. K., *Genome Biol*, 2003, 4:111). Por ejemplo, actualmente hay 84 miembros identificados del grupo de tirosina quinasas, que incluye receptores de factores de crecimiento transmembrana tales como EGFR y PDGFR, y enzimas solubles tales como las Src quinasas, 61 miembros actualmente identificados del grupo dependiente de nucleótidos cíclicos, ser/thr quinasas que incluye las quinasas dependientes de lípidos: las isoformas de PKC, y 45 miembros actualmente identificados del grupo "STE", que incluye los componentes de la vía de señalización mitogénica de MAP quinasas.

Las quinasas son reguladores ubicuos de las vías de transducción de señales intracelulares, y como tales, las compañías farmacéuticas que buscan terapias más selectivas para una amplia gama de enfermedades y trastornos se han centrado intensamente en ellas; solo son superadas por los receptores acoplados a la proteína G en términos de priorización farmacéutica (Cohen, P., *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1:309-15). Las dianas intracelulares para la

fosforilación incluyen otras quinasas, factores de transcripción, proteínas estructurales tales como la actina y la tubulina, enzimas que participan en la replicación y transcripción del ADN y en la traducción de proteínas, y enzimas metabólicas (Cohen, P., *Trends Biochem Sci*, 2000, 25:596-601). La fosforilación puede causar cambios en la actividad catalítica, especificidad, estabilidad, ubicación y asociación con otras biomoléculas de las proteínas. La fosforilación simultánea en múltiples sitios de una proteína, con diferentes consecuencias funcionales, es común y central para la integración de las vías de señalización.

Cada quinasa puede fosforilar una o más proteínas diana, a veces en múltiples sitios, así como autofosforilarse dentro de uno o más dominios reguladores que controlan la actividad catalítica o la interacción con otras biomoléculas. La definición de las consecuencias funcionales de los perfiles de fosforilación celular para estados normales y patológicos es una importante iniciativa proteómica. Sin embargo, para usar este conocimiento para decidir qué quinasas serán las dianas para el descubrimiento de fármacos, también se debe delimitar su especificidad para los sustratos aceptores. Las quinasas reconocen secuencias lineales específicas de sus proteínas diana que a menudo se dan en los pliegues de beta. Por lo general, los aminoácidos que flanquean el resto fosforilado de tres a cinco restos a cada lado definen un sitio de fosforilación. La base de datos Phospho-Base, que compila sitios conocidos de fosforilación de quinasas, contiene entradas para 133 quinasas humanas, menos de un tercio del total de las quinasas. Además, la mayoría, si no todos estos perfiles de especificidad están incompletos, ya que solo muestran uno o dos péptidos que se han identificado como sustratos para cada quinasa. Aunque existe un importante solapamiento en la especificidad del sustrato entre las quinasas relacionadas, no existe una secuencia de consenso que sea fosforilada por un gran número de quinasas.

La justificación biológica para dirigirse a las quinasas para que intervengan en el cáncer es demasiado extensa como para intentar describirlas de manera general en el presente documento. Sin embargo, uno de los temas dominantes es la participación de numerosas quinasas en el control del delicado equilibrio entre la velocidad de división celular (progresión del ciclo celular), el crecimiento celular (masa) y la muerte celular programada (apoptosis) que se altera en todos los cánceres. Las tirosina quinasas receptoras de factores de crecimiento (RTK) son proteínas que abarcan la membrana y transducen las señales de factores de crecimiento peptídicos desde fuera de la célula a las vías intracelulares que conducen a la activación de genes que potencian el crecimiento y antiapoptóticos. La mayoría de las cincuenta y ocho RTK de los seres humanos son oncogenes dominantes, lo que significa que la activación aberrante o la sobreexpresión causan un fenotipo celular maligno. No es sorprendente que, las tirosina quinasas se persiguen agresivamente como dianas farmacológicas contra el cáncer, y se han aprobado clínicamente inhibidores de moléculas pequeñas y de anticuerpos monoclonales: GLEEVEC y HERCEPTIN, respectivamente. La señalización corriente abajo de los receptores de factores de crecimiento se produce a través de múltiples vías en las que participan tanto ser/thr quinasas como tirosina quinasas. Una de las quinasas dominantes es la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que incluye quinasas Raf y MEK; en la actualidad, se están probando inhibidores de todas estas quinasas en ensayos clínicos (Dancey, J. y Sausville, E. A., *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2:296-313). Las tirosina quinasas solubles, en especial, los 11 oncogenes que componen la familia Src, también transducen señales mitogénicas iniciadas por las RTK y que son dianas de fármacos (Warmuth, M., y col., *Curr Pharm Des*, 2003, 9:2043-59). Siguiendo las señales mitogénicas a través de las RTK que inician la entrada en la fase G1, se regula la progresión a través del ciclo celular mediante la activación secuencial de las quinasas específicas de la fase en asociación con las proteínas ciclinas. Las quinasas dependientes de la ciclina representan otro grupo importante de quinasas que la industria farmacéutica está persiguiendo con la esperanza de inhibir la proliferación de células malignas (Elsayed, Y. A. y Sausville, E. A., *Oncologist*, 2001, 6:517-37).

Así pues, los ensayos realizados en el presente documento, pueden usarse para cribar bancos de fármacos en busca de inhibidores o activadores de proteínas quinasas. También será útil para seleccionar péptidos o proteínas como sustratos aceptores de quinasas. En estas aplicaciones, tendrá ventajas significativas frente a otros procedimientos, tales como la naturaleza universal del ensayo, ensayo homogéneo simplificado, sin radiactividad, y la capacidad de cuantificar el recambio enzimático.

Dependiendo de la molécula diana, un compuesto de prueba, identificado mediante los procedimientos incorporados en el presente documento, sería aquel que fuera útil en el tratamiento de esas enfermedades o trastornos para los que la molécula diana desempeña un papel o contribuye directamente a la enfermedad o el trastorno.

*Transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET):* La FRET es un procedimiento sin radiación en el que se transfiere energía de una molécula donante excitada a una molécula aceptora. La transferencia de energía sin radiación es el procedimiento mecánico cuántico mediante el que la energía del estado excitado de un fluoróforo se transfiere sin emisión de fotones a un segundo fluoróforo. Los principios físicos cuánticos se revisan en Jovin y Jovin, 1989, "Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry", eds. E. Kohen y J. G. Hirschberg, Academic Press. En resumen, un fluoróforo absorbe energía luminosa a una longitud de onda característica. Esta longitud de onda también se conoce como la longitud de onda de excitación. En la FRET, la energía absorbida por un fluoróforo se transfiere posteriormente mediante un procedimiento no radiactivo a un segundo fluoróforo. El primer fluoróforo, en general, se denomina donante (D) y tiene un estado excitado de mayor energía que el del segundo fluoróforo, denominado el aceptador (A).

Las características fundamentales del procedimiento son que el espectro de emisión del fluoróforo donante se superpone con el espectro de excitación del aceptador, y que el donante y el aceptor están lo suficientemente cerca.

La distancia entre D y A debe ser lo suficientemente pequeña como para permitir la transferencia de energía sin radiación entre los fluoróforos. Como la velocidad de transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre el donante y el receptor, La eficiencia de transferencia de energía es extremadamente sensible a los cambios de distancia. Se dice que la transferencia de energía ocurre con una eficiencia detectable en el intervalo de distancia de 1-10 nm, pero normalmente es de 4-6 nm para obtener resultados óptimos. El intervalo de distancia sobre el que es efectiva la transferencia de energía sin radiación también depende de muchos otros factores, incluyendo la eficiencia cuántica de fluorescencia del donante, el coeficiente de extinción del aceptador, el grado de superposición de sus respectivos espectros, el índice de refracción del medio y la orientación relativa de los momentos de transición de los dos fluoróforos.

Las fracciones donantes fluorescentes y las correspondientes fraccionesceptoras, en general, se seleccionan para (a) transferencia de energía Forster de alta eficiencia; (b) un gran desplazamiento final de Stokes (> 100 nm); (c) desplazamiento de la emisión tanto como sea posible hacia la parte roja del espectro visible (> 600 nm); y (d) desplazamiento de la emisión a una longitud de onda más alta que la emisión fluorescente de agua de Raman producida por la excitación en la longitud de onda de excitación del donante. Por ejemplo, se puede seleccionar una fracción fluorescente donante que tenga su máximo de excitación cerca de una línea láser (por ejemplo, Helio-Cadmio 442 nm o Argón 488 nm), un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico y una buena superposición de su emisión fluorescente con el espectro de excitación de la fracción fluorescente aceptora correspondiente. Se puede seleccionar una fracción fluorescente aceptora correspondiente que tenga un alto coeficiente de extinción, un alto rendimiento cuántico, una buena superposición de su excitación con la emisión de la fracción fluorescente donante y la emisión en la parte roja del espectro visible (> 600 nm).

Un experto en la materia reconocerá que muchas moléculas de fluoróforo son adecuadas para la FRET. Un fluoróforo es un componente fluorescente, o grupo funcional, unido a una molécula. Un fluoróforo puede ser una molécula fluorescente, una perla brillante, un liposoma brillante, un punto cuántico ("QD"), una nanopartícula fluorescente o fosforescente ("NP"), una partícula fluorescente de látex o microperla. Una molécula fluorescente puede ser fluoresceína, carboxifluoresceína y otros derivados de fluoresceína, rodamina y sus derivados, o cualquier otra entidad brillante capaz de formar un enlace covalente con el ligando.

En una realización, las proteínas fluorescentes se usan como fluoróforos. Hay una gran variedad de fluoróforos disponibles, y se pueden usar en los procedimientos descritos en el presente documento, por ejemplo y sin limitación: Flúores ALEXA (sondas moleculares/Invitrogen) y Flúores DYLIGHT (Thermo Fisher Scientific). Estos fluoróforos tienen un espectro de emisión que abarca un amplio intervalo, incluyendo los intervalos ultravioleta, ultravioleta cercano, visible, infrarrojo cercano e infrarrojo. Las fracciones fluorescentes donantes representativas que se pueden usar con diferentes fracciones fluorescentesceptoras en la tecnología FRET incluyen fluoresceína, Lucifer Yellow, B-ficoeritrina, 9-acridinisotiocianato, Lucifer Yellow VS, ácido 4-acetamido-4'-isotio-cianatostilbeno-2,2'-disulfónico, 7-dietilamino-3- (4'-isotiocianatofenil) 4-metilcumarina, succinimidil-1-pirenobutirato y derivados del ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatostilbeno-2,2'-disulfónico, quelatos de iones lantánidos (por ejemplo, Europio, Disprobio, Samario o Terbio). Las fracciones fluorescentesceptoras representativas, dependiendo de la fracción fluorescente donante usada, incluyen LC-Red 640, LC-Red 705, Cy5, Cy5.5, Sulfonil-cloruro de lisamina rodamina B, isotiocianato de tetrametil-rodamina, rodamina x isotiocianato, isotiocianato de eritrosina, fluoresceína, pentaacetato de dietilentriammina, alofocianina, XL665, d2. Se pueden obtener fracciones fluorescentes donantes yceptoras, por ejemplo, de Molecular Probes (Junction City, Oreg.) o Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

Ciertos aminoácidos naturales, tales como el triptófano, son fluorescentes. Los aminoácidos también pueden derivatizarse, por ejemplo, uniendo un grupo fluorescente a un aminoácido (tal como uniendo AEDANS a un Cys), para crear un par fluoróforo para la FRET. El par AEDANS-Cys comúnmente se usa para detectar cambios e interacciones conformacionales de proteínas. Algunas otras formas de grupos de fluorescencia también se han usado para modificar aminoácidos y generar FRET dentro de los fragmentos de proteínas (por ejemplo, 2,4-dinitrofenil-lisina con S-(N-[4-metil-7-dimetilaminocoumarin-3-il]-carboxamidometil)-cisteína-e-).

En otra realización, que es especialmente adecuada para usar en células vivas, se usan la proteína verde fluorescente (GFP) y sus diversos mutantes como fluoróforos. También se pueden usar proteínas fluorescentes rojas tales como DsRed (Clontech), que tienen un máximo de excitación de 558 nm y un máximo de emisión de 583. Se encuentran ejemplos de proteínas fluorescentes en las bases de datos públicas Genbank y SwissPro.

La FRET entre dos fluoróforos diferentes se puede analizar mediante varios procedimientos: mirando el cambio de color de la fluorescencia, midiendo la vida útil de la fluorescencia del donante, examinando los cambios tras el fotoblanqueamiento, ya sea del donante o del aceptor. Independientemente del enfoque, la mayoría de estos ensayos comparten características comunes de la instrumentación. Son ejemplos el lector de placas EnVision (Molecular Devices), generador de imágenes de microplaca ViewLux UltraHTS (PerkinElmer), lectores de microplacas OPTIMA, FLUOstar y POLARstar (BMG Labtech). La medición preferida es mediante fluorimetría de resolución temporal.

La FRET entre dos fluoróforos diferentes se puede analizar mediante detección celular de alto contenido usando un instrumento que detecte los cambios en la fluorescencia de las células o en ubicaciones subcelulares particulares. Son ejemplos de dichos instrumentos el analizador INCell (GE Healthcare), el sistema de detección de alto contenido ImageXpress Micro (Molecular Devices), Opera, Operetta (PerkinElmer), Lector Cellomics ArrayScan VTI HCS

(Thermo Scientific).

En lugar de generar la transferencia de energía no radiactiva a un fluoróforo aceptor irradiando un fluoróforo donante, es posible lograr una transferencia no radiactiva de energía desde una enzima donante a un fluoróforo aceptor complementario después de la oxidación del sustrato. Dicho procedimiento se denomina transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Son ejemplos de enzimas donantes la luciferasa o la aequorina, los sustratos pueden ser luciferina o coelenterazina y el fluoróforo aceptor puede ser GFP, YFP, EGFP, GFP<sup>2</sup> o GFP10 (Pfleger K. y col, *Nature Protocols*, 2006, 1, 337-345). La BRET puede detectarse usando un luminómetro o un espectrómetro de barrido.

Las realizaciones de la invención también se dirigen a diferentes ensayos de FRET, tales como, por ejemplo: FRET en estado estacionario, vida útil de la fluorescencia, FRET resuelta en el tiempo, FRET intramolecular o FRET intermolecular. Un ejemplo de FRET intramolecular es aquel entre dos cromóforos marcados dentro de una sola molécula (por ejemplo, para identificar los cambios de configuración por una molécula). En ciertas realizaciones, se puede medir la FRET intramolecular de una molécula en ausencia de cualquier otra molécula. En ciertas realizaciones, se puede medir la FRET intramolecular en presencia de una o más proteínas que interactúan (por ejemplo, cualquier interacción ligando-receptor).

La FRET como se proporciona en el presente documento también se puede detectar intermolecularmente, por ejemplo, entre dos o más cromóforos marcados en dos o más moléculas diferentes.

El factor Z' se usa para evaluar la calidad del ensayo durante todo el desarrollo (Zhang J. H. y col. *J Biomol Screen.* 1999;4(2):67-73). El factor Z' integra el intervalo dinámico de las señales de ensayo (diferencia entre la media de los controles positivos y la media de los controles negativos) y la variabilidad estadística de las señales, y varía de 0 (mala calidad) a 1 (alta calidad). Cuanto mayor sea el valor de Z', mayor es la robustez del ensayo, indicando los valores iguales o superiores a 0,5 un ensayo excelente.  $Z' = 1 - [3 \times (DT_{C+} + DT_{C-}) / (Media_{C+} - Media_{C-})]$  en la que  $DT_{C+}$  = desviación típica del control positivo (señal máxima);  $DT_{C-}$  = desviación típica del control negativo (señal mínima);  $Media_{C+}$  = valor medio del control positivo;  $Media_{C-}$  = valor medio del control negativo.

*Recipientes de muestras:* Aunque descrito anteriormente como una cubeta, las realizaciones de la invención son eficaces en cualquier número de geometrías de recipientes, recipientes y vasos. Así pues, los ensayos pueden realizarse en un tubo, vial, plato, celda de flujo, casete, cartucho, chip microfluídico y cualquier otro tipo similar de recipiente. En otras realizaciones, el recipiente puede estar compuesto de una gran cantidad de materiales, en cualquier forma y de cualquier tipo. Por lo tanto, el formato del ensayo también se puede aplicar a un casete o cartucho de plástico o vidrio aplanado, en el que los componentes del ensayo pueden ser arrastrados magnéticamente a lo largo de un canal o de una trayectoria por un imán externo. Por lo tanto, se prevén varias realizaciones o geometrías para el recipiente de ensayo, incluyendo cubetas que tienen un área superficial translúcida o abierta permeable a la irradiación a la longitud de onda de excitación para permitir un ensayo fluorescente. Por ejemplo, el área superficial de la cubeta translúcida, puede tener la forma de un recipiente cuadrado, rectangular, circular, ovalado o plano, perlas, vial, tubo, cilindro, casete o cartucho. La realización preferida es una placa de microtitulación de varias paredes.

En algunas realizaciones, el recipiente comprende: una cubeta, placa de varios pocillos, tubo, matraz, disco, perlas, vial, casete, celda de flujo, cartucho, chip microfluídico o combinaciones de los mismos, que permiten la irradiación a la longitud de onda del fluoróforo donante y la medición a la longitud de onda del fluoróforo aceptor.

En algunas realizaciones, los procedimientos y ensayos descritos en el presente documento se proporcionan en un formato de ensayo de cribado de alto rendimiento. Los beneficios de dichos formatos son fácilmente identificables, tales como, por ejemplo, el cribado de grandes muestras de pacientes con fines de diagnóstico o pronóstico, el cribado de nuevos fármacos, investigación y similares.

#### *Agentes candidatos/de prueba:*

Los agentes candidatos incluyen numerosas clases químicas, aunque normalmente son compuestos orgánicos que incluyen compuestos orgánicos pequeños, ácidos nucleicos que incluyen oligonucleótidos y péptidos. Los compuestos orgánicos pequeños pueden tener adecuadamente, por ejemplo, un peso molecular de más de aproximadamente 40 o 50, aunque menos de aproximadamente 2.500. Los agentes candidatos pueden comprender grupos químicos funcionales que interactúan con proteínas y/o ADN.

Los agentes candidatos pueden obtenerse a partir de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bancos de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo la expresión de oligonucleótidos aleatorizados. Como alternativa, se puede acceder a o producir fácilmente bancos de compuestos naturales en forma de, por ejemplo, extractos de bacterias, hongos y animales.

*Bancos de compuestos químicos:* Los desarrollos en la química combinatoria permiten la síntesis rápida y económica de cientos a miles de compuestos diferenciados. Estos compuestos normalmente se disponen en bancos de tamaños moderados de pequeñas moléculas diseñadas para el cribado eficaz. Los procedimientos combinatorios pueden usarse para generar bancos sin sesgo adecuados para la identificación de nuevos compuestos. Además, pueden

generarse bancos más pequeños, menos diversos, que descienden de un único compuesto precursor con una actividad biológica previamente determinada. En cada caso, la carencia de sistemas de cribado eficaces para marcar como diana específicamente las moléculas biológicas terapéuticamente relevantes producidas por química de combinación tales como inhibidores de enzimas importantes obstaculiza el uso óptimo de estos recursos.

5 Un banco combinatorio de compuestos químicos es una colección de diversos compuestos químicos generados bien por síntesis química o síntesis biológica, combinando un número de "componentes básicos" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, un banco combinatorio lineal de compuestos químicos, tal como un banco de polipéptidos, se forma combinando un conjunto de componentes básicos químicos (aminoácidos) en un gran número de combinaciones y, potencialmente, de cualquier forma posible, para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto de polipéptido). Pueden sintetizarse millones de compuestos químicos a través de tal mezcla combinatoria de componentes básicos químicos.

10 Un "banco" puede comprender de 2 a 50.000.000 diversos compuestos miembros. Preferentemente, un banco comprende al menos 48 compuestos diversos, preferentemente, 96 o más compuestos diversos, más preferentemente, 384 o más compuestos diversos, más preferentemente, 10.000 o más compuestos diversos, preferentemente, más de 100.000 miembros diversos y, lo más preferentemente, más de 1.000.000 compuestos miembros diversos. Por "diverso" se entiende que más del 50 % de los compuestos de un banco tienen estructuras químicas que no son idénticas a ningún otro miembro del banco. Preferentemente, más del 75 % de los compuestos de un banco tienen estructuras químicas que no son idénticas a ningún otro miembro de la colección, más preferentemente, más del 90 % y, lo más preferentemente, más del aproximadamente 99 %.

20 La preparación de bancos combinatorios de compuestos químicos es bien conocida por los expertos en la materia. Para revisiones, véase Thompson y col., "Synthesis and application of small molecule libraries", *Chem Rev* 96:555-600, 1996; Kenan y col., "Exploring molecular diversity with combinatorial shape libraries", *Trends Biochem Sci* 19:57-64, 1994; Janda, "Tagged versus untagged libraries: methods for the generation and screening of combinatorial chemical libraries", *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 91:10779-85, 1994; Lebl y col., "One-bead-one-structure combinatorial libraries", *Biopolymers* 37:177-98, 1995; Eichler y col., "Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries", *Med Res Rev.* 15:481-96, 1995; Chabala, "Solid-phase combinatorial chemistry and novel tagging methods for identifying leads", *Curr Opin Biotechnol.* 6:632-9, 1995; Dolle, "Discovery of enzyme inhibitors through combinatorial chemistry", *Mol Divers.* 2:223-36, 1997; Fauchere y col., "Peptide and nonpeptide lead discovery using robotically synthesized soluble libraries", *Can J. Physiol Pharmacol.* 75:683-9, 1997; Eichler y col., "Generation and usation of synthetic combinatorial libraries", *Mol Med Today* 1: 174-80, 1995; y Kay y col., "Identification of enzyme inhibitors from phage-displayed combinatorial peptide libraries", *Comb Chem High Throughput Screen* 4:535-43, 2001.

35 Pueden usarse también otras químicas para generar bancos de diversidad química. Dichas químicas incluyen, pero sin limitación, peptoides (publicación PCT n.º WO 91/19735); péptidos codificados (publicación PCT WO 93/20242); Biolígmeros aleatorios (publicación PCT n.º WO 92/00091); benzodiazepinas (patente de EE.UU. n.º 5.288.514); diversómeros, tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs, y col., *Proc. Nat. Acad. Sci.* EE.UU., 90:6909-6913 (1993)); polipéptidos vinólogos (Hagihara, y col., *J. Amer. Chem. Soc.* 114:6568 (1992)); peptidomiméticos no peptídicos con armazón de beta-D-glucosa (Hirschmann, y col., *J. Amer. Chem. Soc.*, 114:9217-9218 (1992)); síntesis orgánica análogas de pequeños bancos de compuestos (Chen, y col., *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661 (1994)); oligocarbamatos (Cho, y col., *Science*, 261:1303 (1993)); y/o peptidil fosfonatos (Campbell, y col., *J. Org. Chem.* 59:658 (1994)); bancos de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, Berger y Sambrook, todo *supra*); bancos de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.539.083); bancos de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn, y col., *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314 (1996) y PCT/US96/10287); bancos de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Liang, y col., *Science*, 274:1520-1522 (1996) y la patente de EE.UU. n.º 5.593.853); bancos pequeños de moléculas orgánicas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&E News, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides (patente de EE.UU. n.º 5.569.588); tiazolidinonas y metatiazanonas (patente de EE.UU. n.º 5.549.974); pirrolidinas (patentes de EE.UU. n.º 5.525.735 y 5.519.134); compuestos de morfolino (patente de EE.UU. n.º 5.506.337); benzodiazepinas (patente de EE.UU. n.º 5.288.514); y similares.

50 Los dispositivos para la preparación de bancos combinatorios están disponibles en el mercado (véase, por ejemplo, por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem. Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Además, en el mercado, se dispone de numerosos bancos combinatorios (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N. J., Asinex, Moscú, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., ChemStar, Ltd., Moscú, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Bio sciences, Columbia, Md., etc.).

55 Los ensayos de cribado de la invención incluyen adecuadamente e incorporan modelos animales, sistemas basados en células y sistemas no basados en células. Los genes identificados, las variantes, fragmentos u oligopéptidos de los mismos se usan para identificar agentes de interés terapéutico, por ejemplo, mediante el cribado de bancos de compuestos o identificando de otro modo compuestos de interés mediante cualquiera de una variedad de técnicas de análisis o cribado de fármacos. El gen, alelo, Fragmento u oligopéptido del mismo empleado en dicho cribado puede estar libre en solución, pegado a un soporte sólido, portado en una superficie celular o ubicado intracelularmente. Las mediciones se realizarán como se describe en detalle en el apartado de ejemplos que figura más adelante.

60 En algunas realizaciones, un procedimiento de identificación de agentes terapéuticos candidatos comprende el cribado

de una muestra que contiene la molécula diana específica en un ensayo de cribado de alto rendimiento que comprende las etapas de: (i) añadir un primer y un segundo ligando, teniendo cada uno un primer y un segundo marcador detectable, (ii) unir el primer y el segundo ligando a sitios separados y específicos de una molécula diana específica, en el que el ensayo de cribado omite la etapa de (iii) lavar y detectar una emisión de luz cuando el primer y el segundo ligando se unen específicamente a la molécula diana específica.

En otra realización preferida, un procedimiento de identificación de agentes terapéuticos comprende poner en contacto: (i) una molécula diana con un agente terapéutico candidato; determinar si (i) el agente modula una función del péptido o la interacción del péptido con una molécula asociada; o (ii) el agente modula la expresión y/o la función de la secuencia de ácido nucleico de la diana medida por los ensayos de emisión de luz incorporados en el presente documento.

En otra realización preferida, un procedimiento de identificación de agentes terapéuticos candidatos para el tratamiento de enfermedades comprende el cultivo de una célula aislada que expresa una molécula diana, administrar un agente terapéutico candidato a la célula cultivada; correlacionar la expresión, actividad y/o función de moléculas diana en presencia o ausencia de un agente terapéutico candidato en comparación con las células de control, en el que se identifica un fármaco basándose en los resultados terapéuticos deseables. Por ejemplo, un fármaco que modula la expresión de la molécula diana mediante la que los niveles de expresión son responsables del estado patológico o la molécula diana modula la actividad de otra molécula ya sea corriente arriba o corriente abajo en una vía. En otros ejemplos, los ensayos miden la actividad de la quinasa. En otros ejemplos, el ensayo mide parejas de unión.

Otro procedimiento adecuado para el diagnóstico y el descubrimiento de fármacos candidatos incluye la puesta en contacto de una muestra de prueba con una célula que expresa una molécula diana, y la detección de la interacción del agente de prueba con la molécula diana, un alelo o fragmento del mismo, o producto de expresión de la molécula diana, un alelo o fragmento del mismo.

En otra realización preferida, se aísla una célula de un paciente y se pone en contacto con una molécula terapéutica candidata. Los genes, productos de expresión de los mismos, se controlan para identificar qué genes o productos de expresión están regulados por el fármaco.

#### *Cribado de alto rendimiento*

Los ensayos incorporados en el presente documento son adecuados para el cribado de fármacos en un cribado de alto rendimiento de compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada con la proteína de interés (véase, por ejemplo, Geysen y *col.*, 1984, Solicitud PCT WO84/03564). En este procedimiento, se sintetizan grandes cantidades de diferentes compuestos de prueba pequeños sobre un sustrato sólido. Los compuestos de prueba se hacen reaccionar con genes identificados, o fragmentos de los mismos, y se lavan. Las moléculas unidas se detectan luego mediante los procedimientos incorporados en el presente documento. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos no neutralizantes para capturar al péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

Los procedimientos de cribado de la invención comprenden el uso de ensayos de cribado para identificar, de un banco de diversas moléculas, uno o más compuestos que tengan una actividad deseada. Un "ensayo de cribado" es un ensayo selectivo diseñado para identificar, aislar y/o determinar la estructura de compuestos dentro de una colección, que tienen una actividad preseleccionada. Por "identificación" se entiende que se aísla un compuesto que tiene una actividad deseable, se determina su estructura química (incluyendo, entre otras, la determinación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ácidos nucleicos y polipéptidos, respectivamente), la estructura de y, además o como alternativa, purificar, los compuestos que tienen la actividad detectada. Los ensayos bioquímicos y biológicos están diseñados para evaluar la actividad en una amplia selección de sistemas que varían desde interacciones proteína-proteína, catálisis enzimática, unión a proteínas de molécula pequeña, a las funciones celulares. Dichos ensayos incluyen ensayos automáticos, semiautomáticos y HTS (cribado de alto rendimiento).

En los procedimientos HTS, se prueban muchos compuestos diferenciados, preferentemente, en paralelo mediante procedimientos de robótica, automáticos o semiautomáticos para cribar un gran número de compuestos de prueba en busca de una actividad deseada simultáneamente o casi simultáneamente. Es posible analizar y cribar hasta de aproximadamente 6.000 a 20.000, e incluso hasta de aproximadamente 100.000 a 1.000.000 de compuestos diferentes al día usando los sistemas integrados de la invención.

Por lo general, en la HTS, las moléculas diana se administran o cultivan con células aisladas con receptores modulados, incluyendo los controles apropiados.

En una realización, el cribado comprende poner en contacto cada cultivo celular con un banco diverso de compuestos miembros, algunos de los cuales son ligandos de la diana, en condiciones en las que se pueden formar complejos entre la diana y los ligandos, e identificar qué miembros de los bancos están presentes en dichos complejos. En otra modalidad no limitante, el cribado comprende poner en contacto una enzima diana con un banco diverso de compuestos miembros, algunos de los cuales son inhibidores (o activadores) de la diana, en condiciones en las que un producto o un reactivo de la reacción catalizada por la enzima produce una señal detectable. En la última modalidad, los inhibidores de la enzima diana disminuyen la señal de un producto detectable o aumentan la señal de un reactivo detectable (o viceversa para los activadores).



Los procedimientos desvelados en el presente documento pueden usarse para seleccionar una pluralidad de compuestos de prueba. En ciertas realizaciones, la pluralidad de compuestos de prueba comprende entre 1 y 200.000 compuestos de prueba, entre 1 y 100.000 compuestos de prueba, entre 1 y 1.000 compuestos de prueba, entre 1 y 100 compuestos de prueba, o entre 1 y 10 compuestos de prueba. En ciertas realizaciones, los compuestos de prueba son proporcionados por bancos de compuestos, ya sea disponibles en el mercado o no, usando técnicas de química combinatoria. En ciertas realizaciones, los bancos de compuestos se inmovilizan sobre un soporte sólido.

Como se ha analizado anteriormente, la diana puede estar presente en cualquier sustrato, ya que los parámetros del ensayo pueden manipularse u optimizarse para cada tipo de sustrato. Por ejemplo, si la diana está en la superficie de o en una célula, o es secretada por una célula, se determinarían los siguientes parámetros: estirpe celular óptima, densidad celular, medio de cultivo, concentración en suero, volúmenes de reactivos finales, tiempos de incubación del compuesto (por ejemplo, 12, 24 o 36 horas). Si la diana está en una solución libre de células, se puede determinar la composición óptima de la solución, así como el intervalo de concentraciones del patrón de control positivo. Otros parámetros que se pueden determinar son las concentraciones de ligando, la temperatura de incubación y los tiempos de incubación de los ligandos (por ejemplo, de 1 a 4 horas). La configuración del instrumento de lectura, por ejemplo, un fluorímetro de resolución temporal, está optimizada para la ventana de medición y la demora temporal, los parámetros de excitación (por ejemplo, número de destellos aplicados), el ajuste de la ganancia y el posicionamiento del cabezal del lector con respecto al receptáculo. El control farmacológico adecuado, si está disponible, necesita ser determinado.

El cribado de alto rendimiento se puede usar para medir los efectos de los fármacos en eventos moleculares complejos, tales como las vías de transducción de señales, así como funciones celulares que incluyen, pero sin limitación, función celular, apoptosis, división celular, adhesión celular, locomoción, exocitosis y comunicación célula-célula. La fluorescencia multicolor permite analizar múltiples dianas y procedimientos celulares en una sola pantalla. La correlación cruzada de las respuestas celulares generará una gran cantidad de información necesaria para la validación de la diana y la optimización de precursores.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para analizar células que comprende proporcionar una matriz de ubicaciones que contienen múltiples células, en las que las células contienen una o más moléculas indicadoras fluorescentes; escanear múltiples células en cada una de las ubicaciones que contienen células para obtener señales fluorescentes de la molécula indicadora fluorescente en las células; convertir las señales fluorescentes en datos digitales; y utilizar los datos digitales para determinar la distribución, el entorno o la actividad de la molécula indicadora fluorescente dentro de las células.

*Micromatrices:* La identificación de una secuencia de ácido nucleico capaz de unirse a una molécula diana se puede lograr inmovilizando un banco de ácidos nucleicos en la superficie del sustrato para que cada ácido nucleico único se ubique en una posición definida para formar una matriz. Por lo general, el banco inmovilizado de ácidos nucleicos se expone a una biomolécula o agente candidato en condiciones que favorecen la unión de la biomolécula a los ácidos nucleicos. La matriz de ácido nucleico se analizaría luego mediante los procedimientos incorporados en el presente documento para determinar qué secuencias de ácido nucleico se unen a la biomolécula. preferentemente, las biomoléculas llevarían un marcador predeterminado para su uso en el cribado de la ubicación de los ácidos nucleicos unidos.

Se puede usar un ensayo que use una matriz inmovilizada de secuencias de ácido nucleico para determinar la secuencia de un ácido nucleico desconocido; análisis de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP); análisis de patrones de expresión génica de una determinada especie, tejido, tipo de célula, etc.; identificación de genes; etc.

En realizaciones adicionales, se pueden usar oligonucleótidos, o fragmentos más largos derivados de cualquiera de las secuencias de polinucleótidos, como dianas en una micromatriz. La micromatriz se puede usar para controlar la identidad y/o el nivel de expresión de un gran número de genes y transcripciones de genes simultáneamente a fin de identificar genes con los que interactúan genes diana o su producto y/o para evaluar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos en la regulación de productos de expresión de genes que median, por ejemplo, en trastornos neurológicos. Esta información puede usarse para determinar la función del gen, y para desarrollar y controlar las actividades de los agentes terapéuticos.

Se pueden preparar, usar y analizar micromatrices usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brennan y col., 1995, patente de EE.UU. n.º 5.474.796; Schena y col., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 93: 10614-10619; Baldeschweiler y col., 1995, Solicitud PCT WO95/251116; Shalon, y col., 1995, Solicitud PCT WO95/35505; Heller y col., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94: 2150-2155; y Heller y col., 1997, patente de EE.UU. n.º 5.605.662). En otras realizaciones, una micromatriz comprende péptidos u otras moléculas deseadas que pueden analizarse para identificar un agente candidato.

#### Utilidades

En ciertas realizaciones, el ensayo proporciona un procedimiento para diagnosticar una enfermedad o un trastorno que comprende el cribado de una muestra biológica de un paciente para identificar y/o cuantificar un marcador o una molécula que diagnostique la enfermedad o el trastorno en particular. Por ejemplo, un marcador genético, marcador

proteico y similares.

En determinadas realizaciones preferidas, el cribado se realiza usando un cribado de alto rendimiento que permite el diagnóstico simultáneo de muchos sujetos al mismo tiempo.

5 En otra realización preferida, un procedimiento de identificación de sujetos en riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno que comprende examinar una muestra biológica de un paciente e identificar un marcador o una molécula que diagnostique la enfermedad o el trastorno en particular.

10 En otra realización preferida, un procedimiento de cribado de compuestos candidatos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o un trastorno comprende poner en contacto una muestra con un agente terapéutico candidato y medir los efectos que el compuesto tiene sobre una diana. Por ejemplo, si es un producto celular tal como un receptor, el compuesto puede regular la expresión del receptor y el compuesto puede estudiarse luego en busca de posibles efectos terapéuticos (aumentar o disminuir el parámetro que se controla, por ejemplo, la expresión, el nivel de oxidación, marcadores apoptóticos). Un estado de expresión anómalo puede ser causado por una patología tal como una enfermedad, cáncer, defectos genéticos y/o una toxina.

#### *Kits y procedimientos*

15 La presente divulgación proporciona además sistemas y kits (por ejemplo, productos comerciales terapéuticos, diagnósticos o de investigación, mezclas de reacción, etc.) que contienen uno o más o todos los componentes suficientes, necesarios o útiles para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Estos sistemas y kits pueden incluir tampones, componentes de detección/generación de imágenes, reactivos de control positivo/negativo, instrucciones, software, hardware, acondicionamiento u otros componentes  
20 deseados.

Los kits proporcionan herramientas útiles para cribar compuestos de prueba capaces de modular los efectos de un compuesto en una molécula diana. Los kits se pueden acondicionar de cualquier manera adecuada para ayudar a los laboratorios de investigación, clínicos y de prueba, normalmente, con las diferentes partes, en un recipiente adecuado junto con las instrucciones de uso.

25 En el presente documento, se proporcionan kits para identificar un compuesto que module la interacción entre una molécula diana y un agente de prueba. En ciertos ejemplos, los kits comprenden (a) una molécula diana marcada con un primer cromóforo; y (b) un agente de prueba marcado con un segundo cromóforo. En ciertos ejemplos, los kits pueden comprender además lípidos y/o disolventes. En ciertos ejemplos, los kits pueden comprender además tampones y reactivos necesarios para el procedimiento e instrucciones para llevar a cabo el ensayo. En ciertos  
30 ejemplos, los kits pueden comprender además, cuando sea necesario, agentes para reducir la interferencia de fondo en una prueba, reactivos de control positivo y negativo, aparatos para realizar una prueba, y similares.

35 En ciertos ejemplos de los procedimientos y kits proporcionados en el presente documento, se usan soportes en fase sólida para purificar proteínas, el marcaje de muestras o la realización de ensayos en fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas adecuadas para llevar a cabo los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen perlas, partículas, coloides, superficies individuales, tubos, placas de múltiples pocillos, placas de microtitulación, portaobjetos, membranas, geles y electrodos. Cuando la fase sólida es un material de partículas (por ejemplo, perlas), es, en una realización, distribuido en los pocillos de placas de múltiples pocillos para permitir el procesamiento en paralelo de los soportes en fase sólida.

40 Los procedimientos y kits desvelados en el presente documento pueden llevarse a cabo en numerosos formatos conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento se llevan a cabo usando formatos de ensayo en fase sólida. En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento se llevan a cabo en un pocillo de una placa con una pluralidad de pocillos, tal como una placa de múltiples pocillos o una placa de múltiples pocillos de múltiples dominios. El uso de placas de ensayo de múltiples pocillos permite el procesamiento en paralelo y el análisis de múltiples muestras distribuidas en múltiples pocillos de una placa. Las placas de ensayo de múltiples pocillos (también conocidas como microplacas o placas de microtitulación) pueden adoptar una variedad de formas, tamaños y conformaciones (por ejemplo, placas de múltiples pocillos de fondo redondo o plano). Los ejemplos de formatos de placas de múltiples pocillos que se pueden usar en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen los que se encuentran en placas de 96 pocillos (matriz de pocillos de 12 x 8), placas de 384 pocillos (matriz de pocillos de 24 x 16), placa de 1.536 pocillos (matriz de pocillos de 48 x 32), placas de 3.456 pocillos y placas de 9.600 pocillos. Otros formatos que pueden usarse en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, placas de uno o varios pocillos que comprenden una pluralidad de dominios, cubetas, micromatrices, etc. En ciertas realizaciones, las placas son placas de pared negra, de fondo negro. En ciertas realizaciones, las placas son placas de pared negra, de fondo blanco. En ciertas realizaciones, las placas tienen paredes negras y fondos transparentes para permitir la lectura inferior de las señales de fluorescencia. En ciertas realizaciones, las placas se seleccionan con una intensidad de fluorescencia intrínseca mínima y uniforme dentro del intervalo utilizado en el procedimiento para evitar interferencias con las señales de FRET.  
55

Los procedimientos proporcionados en el presente documento, cuando se llevan a cabo en formatos de placa

estandarizados pueden aprovechar el equipo fácilmente obtenible para almacenar y mover estas placas, así como el equipo fácilmente obtenible para dispensar rápidamente líquidos dentro y fuera de las placas (por ejemplo, dispensador robótico, pipetas multipocillo y multicanal, lavadoras de placas y similares).

#### *Administración de composiciones*

5 Los agentes identificados por los procedimientos incorporados en el presente documento pueden formularse y las composiciones pueden administrarse junto con uno o más principios activos, composiciones farmacéuticas u otros compuestos adicionales. Los agentes terapéuticos pueden administrarse a un animal, preferentemente, un mamífero, preferentemente, un ser humano.

10 Las formulaciones farmacéuticas pueden ser para la administración oral (sólida o líquida), parenteral (intramuscular, intraperitoneal, inyección intravenosa (IV) o subcutánea), transdérmica (ya sea de forma pasiva, o con ionoforesis o electroporación), transmucosa y sistémica (nasal, vaginal, rectal o sublingual), o vías de administración por inhalación, o usando inserciones bioerosionables, y se pueden formular en formas farmacéuticas apropiadas para cada vía de administración.

15 Los agentes pueden formularse en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como solución salina fisiológica o una solución salina tamponada. Los vehículos y diluyentes adecuados pueden seleccionarse basándose en el modo y en la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional. Una descripción de vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables ilustrativos, así como formulaciones farmacéuticas, puede encontrarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", un texto normativo en este campo, y en USP/NF. Pueden añadirse otras sustancias a las composiciones para estabilizar y/o conservar las composiciones.

20 Las composiciones pueden administrarse a animales mediante cualquier técnica convencional. Las composiciones pueden administrarse directamente a un sitio diana mediante, por ejemplo, la administración quirúrgica a un sitio diana interno o externo, o mediante un catéter a un sitio accesible por un vaso sanguíneo. Otros procedimientos de administración, por ejemplo, la administración liposómica o difusión desde un dispositivo impregnado con la composición, se conocen en la técnica. Las composiciones pueden administrarse en un único bolo, múltiples inyecciones o por infusión continua (por ejemplo, por vía intravenosa). Para la administración parenteral, las composiciones se formulan preferentemente en una forma libre de pirógenos esterilizada.

30 Los compuestos identificados por la presente invención también pueden administrarse por vía oral al paciente, de manera que la concentración del fármaco sea suficiente para inhibir la resorción ósea o para lograr cualquier otra indicación terapéutica como se desvela en el presente documento. Por lo general, una composición farmacéutica que contiene el compuesto se administra a una dosis oral de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg en concordancia con el estado del paciente. Preferentemente, la dosis oral sería de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 20 mg/kg.

35 Una infusión intravenosa del compuesto en dextrosa al 5 % en agua o solución salina normal, o una formulación similar con excipientes adecuados, es más eficaz, aunque es también útil una inyección intramuscular en bolo. Por lo general, la dosis parenteral será de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg/kg; preferentemente, entre 0,1 y 20 mg/kg, para mantener la concentración del fármaco en plasma a una concentración eficaz para inhibir una cisteína proteasa. Los compuestos pueden administrarse de una a cuatro veces al día a un nivel que logre una dosis diaria total de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 400 mg/kg/día. La cantidad exacta de un compuesto de la invención que es terapéuticamente eficaz y la vía por la que dicho compuesto se administra mejor, son fácilmente determinadas por un experto en la materia comparando el nivel en sangre del agente con la concentración requerida para que tenga un efecto terapéutico. Se pueden preparar profármacos de los compuestos de la presente invención mediante cualquier procedimiento adecuado. Para aquellos compuestos en los que la fracción de profármaco es una funcionalidad cetona, específicamente, los cetales y/o hemiacetales, la conversión puede realizarse de acuerdo con procedimientos convencionales.

45 No se esperan efectos toxicológicos inaceptables cuando los compuestos, derivados, sales, composiciones etc., de la presente invención se administran de acuerdo con la presente invención. Los compuestos, que puede tener buena biodisponibilidad, pueden probarse en uno de varios ensayos biológicos para determinar la concentración de un compuesto que se requiere para que tenga un efecto farmacológico dado.

50 Se desvela una composición farmacéutica o veterinaria que comprende uno o más compuestos identificados y un vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable. También puede haber presentes otros materiales activos, según se considere apropiado o aconsejable para la enfermedad o afección que se esté tratando o previniendo.

El vehículo o, si hay más de uno presente, cada uno de los vehículos, debe ser aceptable en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación y no perjudicial para el receptor.

55 Los compuestos identificados mediante los procedimientos del presente documento serían adecuados para su uso en una variedad de sistemas de administración de fármacos descritos anteriormente. Además, para mejorar la semivida en suero *in vivo* del compuesto administrado, los compuestos pueden estar encapsulados, introducidos en la luz de los liposomas, preparados como un coloide, o se pueden emplear otras técnicas convencionales que proporcionen

una semivida en suero prolongada de los compuestos. Hay una variedad de procedimientos disponibles para preparar liposomas, como se describe en, por ejemplo, Szoka, *y col.*, patente de EE.UU. n.º 4.235.871, 4.501.728 y 4.837.028. Además, se puede administrar el fármaco en un sistema de administración de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido. Los liposomas serán dirigidos y tomados selectivamente por el órgano.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para la administración rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica), pero, preferentemente, la formulación es una formulación administrada por vía oral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, comprimidos y cápsulas de liberación sostenida, y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica.

Dichos procedimientos incluyen la etapa de asociar el agente activo definido anteriormente con el vehículo. Por lo general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el agente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, moldeando el producto.

El compuesto identificado usando estos procedimientos puede formularse de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los que el compuesto se combina mezclado con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales ("Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™. (ICI Americas Inc., Bridgewater, NJ), PLURONICS™. (BASF Corporation, Mount Olive, N.J.) o PEG.

Las formulaciones que se usarán para la administración *in vivo* deben ser estériles y libres de pirógenos. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución.

Las dosis y las concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas pueden variar dependiendo del uso previsto en particular. La determinación de la dosis o de la vía de administración apropiada es competencia de un médico habitual. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalamiento entre especies de las dosis eficaces puede realizarse siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *y col.*, Eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, pág. 42-96.

Las formulaciones para la administración oral pueden presentarse en forma de: unidades diferenciadas en forma de cápsulas, sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del agente activo; en forma de polvos o gránulos; en forma de una solución o una suspensión del agente activo en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite; o en forma de un bolo etc.

Para composiciones para la administración oral (por ejemplo, comprimidos y cápsulas), la expresión "vehículo aceptable" incluye vehículos tales como excipientes comunes, p. agentes aglutinantes, por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, polivinilpirrolidona (Povidona), metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y almidón; cargas y vehículos, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina, lactosa, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato de dicalcio, cloruro de sodio y ácido algínico; y lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de sodio y otros estearatos metálicos, estearato de glicerol, ácido esteárico, fluido de silicona, ceras de talco, aceites y sílice coloidal. También se puede usar agentes aromatizantes tales como la menta, aceite de gaulteria, aromatizante de cereza y similares. Puede ser deseable añadir un agente colorante para que la forma de dosificación sea fácilmente identificable. Los comprimidos también pueden recubrirse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica.

Un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeo, de manera opcional, con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse prensando en una máquina adecuada el agente activo en forma fluida tal como un polvo o gránulos, mezclados de forma opcional con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeables pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse, y pueden formularse de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada del agente activo.

Otras formulaciones adecuadas para la administración oral incluyen pastillas para chupar que comprenden el agente activo en una base aromatizada, generalmente, sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el agente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica; y colutorios que comprenden el agente activo en un vehículo líquido adecuado.

- 5 En general, las formulaciones parenterales serán estériles.

*Dosis:* Una dosis eficaz de una composición de la materia objeto desvelada en el presente documento se administra a un sujeto que la necesita. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad terapéutica" es una cantidad de una composición terapéutica suficiente para producir una respuesta medible (por ejemplo, una respuesta biológica o clínicamente relevante en un sujeto que está siendo tratado). La respuesta se puede medir de muchas maneras, como se ha analizado anteriormente, por ejemplo, perfiles de citocinas, tipos de célula, moléculas de superficie celular, etc. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones de la materia objeto desvelada en el presente documento pueden variarse para administrar una cantidad de los compuestos activos que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto en particular. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de la actividad de la composición terapéutica, la vía de administración, la combinación con otros fármacos o tratamientos, la gravedad de la afección que se esté tratando, y la afección y el historial médico previo del sujeto que se esté tratando. Sin embargo, está dentro de la habilidad de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se logre el efecto deseado. La potencia de una composición puede variar y, por lo tanto, puede variar una "cantidad eficaz de tratamiento". Sin embargo, usando los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento, un experto en la materia puede evaluar fácilmente la potencia y eficacia de un compuesto candidato de la materia objeto desvelada en el presente documento, y ajustar correspondientemente el régimen terapéutico.

### **Ejemplos**

Si bien se han descrito anteriormente diferentes realizaciones de la presente invención, se ha de entender que se han presentado solo a modo de ejemplo y no como limitación. Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la invención.

#### *Materiales y procedimientos*

*Análisis del mejor par de ligandos.* Se probó un panel de ligandos acoplados a un cromóforo fluorescente para determinar su capacidad para unirse a la diana en la superficie celular o en solución. Se seleccionaron los ligandos que producían una señal robusta específica de la diana. Se comprobó la ausencia de interferencias para unirse a la diana cuando se añadieron los ligandos simultáneamente tras el emparejamiento sistemático (un ligando de "unión" marcado se mezcla con un ligando de "interferencia" no marcado). Finalmente, se realizó un análisis del mejor par de la siguiente manera: se midió la señal generada por cualquier combinación de pares de ligando (un ligando marcado con un cromóforo donante y el otro con un cromóforo receptor, y viceversa) para aumentar las concentraciones de la diana. Se retuvo el par de ligando marcado generador de la señal más potente.

*Cuantificación de PrP recombinante (rPrP) en solución:* Se añade PrP recombinante a los pocillos de una placa de microtitulación en solución salina tamponada con fosfato (PBS). PrP se detecta inmediatamente usando los anticuerpos específicos de PrP SAF32 (aa53-93) y D18 (aa133-157) marcados con los fluoróforos donantes y aceptores, respectivamente. PBS solo se usa como control para la señal de fondo. Para el análisis de datos, se calculan las proporciones (R) de las mediciones de 665 nm (emisión del aceptor) a 620 nm (emisión del donante).

*Determinación de PrP en la superficie celular.* Se añaden células a los pocillos de una placa de microtitulación. Se añaden los compuestos de un banco de cribado, o el control de disolvente (generalmente, DMSO), y se incuban las células durante 24 horas. Después, se detecta la cantidad de PrP presente en la superficie celular en las células vivas. Para detectar PrP en la superficie celular, se usan anticuerpos como ligandos. El mejor par de anticuerpos es SAF32 dirigido contra aa53-93 (Cayman Chemical) y D18 dirigido contra aa133-157 (Williamson R. A., *J. Virol*, 1998, 72 (11), 9413-18) marcado con los fluoróforos donante y aceptor, respectivamente. En este ejemplo concreto, se usó HTRF®, con criptato de terbio como fluoróforo donante y d2 como fluoróforo aceptor. Los anticuerpos fueron marcados mediante Cisbio. Una estirpe celular PrP<sup>0/0</sup> (KO) derivada de neuronas primarias del hipocampo de ratones con deficiencia de genes PrP sirve como control negativo para la expresión de PrP. Los blancos consisten en medio de cultivo en ausencia de células. Para el análisis de datos, se calculan las proporciones (R) de las mediciones de 665 nm (emisión del aceptor) a 620 nm (emisión del donante), para corregir la absorción inespecífica de luz a 620 nm por la mezcla de ensayo. El valor para la señal específica de la muestra o el control positivo viene dado por % Delta F =  $[(R_{C+} - R_{C-}) / R_{C-}] \times 100$ , en la que R<sub>C+</sub> y R<sub>C-</sub> son las proporciones de 665/620 del control positivo y negativo. Esta medición radiométrica permite corregir la interferencia de fluorescencia inducida por la matriz de ensayo o los compuestos de cribado.

*Estirpe celular:* células LD9, una estirpe de células fibroblásticas (Mahal S. y col. *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 2007;104(52):20908-13). Esta estirpe celular presenta un desprendimiento reducido de PrP en el medio y, por lo tanto, menor señal de fondo para PrP en comparación con las células de neuroblastoma.

*Control farmacológico:* Brefeldine A (BFA), un compuesto que previene el tráfico de proteínas desde el RE al aparato

de Golgi (Nebenfuhr A. y col. *Plant physiology*. 2002;130: 1102-8).

*Otras condiciones de ensayo:* Los tiempos de incubación óptimos son de 24 horas para el compuesto, de 3 horas para el anticuerpo. Las concentraciones óptimas de anticuerpos (denominadas x1) son de 0,33 µg/ml (D18-d2) y 0,036 µg/ml (SAF32-Tb).

## 5 Ejemplo 1: Cribado de compuestos

Con el ensayo en el formato de 384 pocillos, se examinó la colección de fármacos de EE. UU., un banco de 1.280 compuestos que comprende principalmente fármacos aprobados por la FDA. El banco se exploró a una concentración de 20 µM. Treinta y ocho compuestos redujeron la expresión de PrP en más del 50 %, que fue seleccionado como el umbral de cribado. El banco se sometió a un posterior cribado usando un ensayo de viabilidad celular para descubrir los compuestos tóxicos. Nueve de los 38 aciertos candidatos presentaron menos del 10 % de toxicidad y se consideraron aciertos (Figura 3). Por lo tanto, la tasa de éxito fue del 0,7 %.

Para confirmar los aciertos, se midieron los niveles de PrP en la superficie celular mediante un procedimiento independiente. Se expusieron células a los compuestos, se lavaron con PBS, se marcaron a +4 °C con anticuerpo monoclonal D18 durante una hora, luego se fijaron con PFA al 4 % antes de la adición del anticuerpo secundario marcado con Alexa-488 para revelar el anticuerpo PrP. La reducción de PrP de la superficie celular puede visualizarse bajo el microscopio de epifluorescencia y cuantificarse mediante citometría de flujo o con un sistema de análisis subcelular de alto contenido, tal como el analizador celular IN 1000 o 2000 (GE Lifesciences). Se confirmaron seis de nueve aciertos, demostrando que el ensayo primario produce aciertos que reducen de manera reproducible los niveles de PrP en la superficie celular. Además, como la diana final de los priones en el organismo vivo es el cerebro, es importante mostrar la actividad de los compuestos en un tipo de células cercanas a las células neuronales. Los seis compuestos redujeron los niveles de PrP en las células de neuroblastoma (N2a). La actividad de Tacrolimus se muestra en las Figuras 4A-4D como ejemplo. Tacrolimus redujo PrP en un 70 % a 20 µM en el ensayo primario (en células LD9), y en un 75 y 73 % a 30 µM en el ensayo secundario (en células N2a) mediante citometría de flujo y cuantificación del analizador de células IN, respectivamente.

Otros compuestos activos fueron Astemizol, Lasalocid sódico, Monensina, Emetina y cetrimonio. La cuantificación de la reducción de PrP mediante Astemizol y Lasalocid sódico se muestra en las Figuras 5A y 5B.

*Contra-cribado:* Los compuestos tóxicos generan una disminución artefactual en la intensidad de la señal de PrP de la superficie celular, y se excluyen. El ensayo de la viabilidad de células luminiscentes de alto rendimiento, CELLTITER-GLO® (Promega) se puede usar con este fin como se muestra en la Figura 3. La adición del reactivo CELLTITER-GLO® da lugar a la lisis celular y la generación de una señal luminiscente a 610 nm proporcional a la cantidad de ATP, reflejando el número de células vivas en cultivo.

*Priorización de compuestos:* Para seleccionar los mejores compuestos de los aciertos generados durante el cribado primario, se puede usar la siguiente estrategia: (1). Selección de los compuestos que ejercen el mayor efecto reductor de PrP. (2). Selección de los compuestos que ejercen el efecto reductor de PrP a la concentración más baja y que albergan la menor toxicidad sobre las células neuronales. Con este fin, deben determinarse la CE<sub>50</sub> y la CT<sub>50</sub> en células N2a usando, por ejemplo, los ensayos descritos anteriormente (IF y Cell Titer Glo). (3). Selección de los compuestos que presentan la mayor especificidad hacia PrP. Aunque no se requiere una especificidad completa hacia PrP para que un compuesto alcance un buen índice terapéutico, esto se puede usar como criterio para la selección de compuestos. Otros marcadores expresados en la superficie de las neuronas, tales como, pero sin limitación, la proteína precursora amiloide (APP) y CD24 (también denominado antígeno termoestable o nectadrina) se detectan mediante IF usando la misma metodología que se usó para detectar PrP en la superficie celular. Después del tratamiento de las células con el compuesto, se compara el grado de reducción de otras proteínas con el de PrP. (4). Selección de los compuestos que muestran la mayor capacidad para curar las células infectadas con priones y para prevenir la infección celular por priones. Los compuestos seleccionados pueden analizarse para determinar su capacidad para inhibir la replicación de priones en células infectadas con priones usando una transferencia Western o el ensayo de células de tembladera (SCA) (Kloehn P. C. y col, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 2003;100(20):11666-71). Estos ensayos detectan células infectadas en virtud de su contenido de PrP<sup>Sc</sup>. El contenido total de PrP<sup>Sc</sup> del cultivo celular se puede medir mediante transferencia Western de lisados celulares; las células infectadas pueden registrarse como "manchas" en el SCA). La Figura 6 ilustra el efecto de curación de células PK1 infectadas con tembladera RML por la enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C (PIPLC), una enzima que escinde las proteínas ancladas a GPI, por tanto, PrP, desde la superficie celular, a 1 µg/ml, una concentración que elimina aproximadamente el 50 % de PrP de la superficie celular. Las Figuras 7A y 7B ilustran que tacrolimus (Tac) y astemizol (Ast), dos compuestos seleccionados usando el procedimiento descrito en el presente documento que reducen las cantidades de PrP de la superficie celular como se muestra en las Figuras 4A-4D y 5A-5B, bloquean la infección de las células de neuroblastoma PK1 por RML y priones 22L. Se trataron previamente células PK1 durante 3 días con las dosis indicadas de fármacos y se infectaron con RML (Figura 7A) o priones 22L (Figura 7B) usando una dilución 10<sup>-4</sup> de homogeneizado cerebral de un ratón infectado con RML o 22L. El tratamiento continuó durante 12 días después de la infección. Las células se analizaron mediante transferencia Western para detectar PrP<sup>Sc</sup> resistente a proteinasa K (una característica distintiva de la infección por priones) 9 y 18 días después de la infección (es decir, 3 días antes y 6 días después de la interrupción del tratamiento). Se usó PPS (polisulfato de pentosano), un fármaco que previene la infección por priones, a la dosis de 10 µg/ml como

control positivo para la eficacia del tratamiento. CTRL: células no tratadas. Tanto el astemizol como el tracrolimus bloquearon la infección por priones, y no hubo rebote de la infectividad una vez cesado el tratamiento.

5 Estos procedimientos para detectar moléculas que inhiben la expresión de PrP en la superficie celular tienen implicaciones más allá del campo de las enfermedades por priones. De hecho, se ha demostrado que PrP media la neurotoxicidad inducida por el oligómero A $\beta$  y el deterioro de la memoria en ratones transgénicos con Alzheimer (Lauren y *col*, *Nature* 2009; 457(7233):1128-32). Por lo tanto, los compuestos que reducen las cantidades de PrP pueden prevenir la neurodegeneración inducida por A $\beta$  en la enfermedad de Alzheimer. Las Figuras 8A-8E muestran que los oligómeros A $\beta$  son tóxicos para las células SK-NSH, pero no para SH-SY5Y, la estirpe celular derivada de SK-NSH que no expresa PrP.

10 Aunque la invención se ha ilustrado y descrito con respecto a una o más implementaciones, se contemplan alteraciones y modificaciones equivalentes por parte de los expertos en la materia tras la lectura y comprensión de la presente memoria descriptiva y los dibujos anexos. Además, aunque una característica particular de la invención puede haberse desvelado con respecto a solo una de varias implementaciones, dicha característica se puede combinar con una o más características de las otras implementaciones que se deseen y sean ventajosas para cualquier aplicación dada o particular.

15 El resumen de la divulgación se proporciona para permitir al lector determinar rápidamente la naturaleza de la divulgación técnica. Se presenta con el entendimiento de que no se usará para interpretar ni limitar el ámbito o el significado de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación y cuantificación de una molécula diana específica en una muestra que comprende:

5 probar y seleccionar un primer ligando o una pluralidad de primeros ligandos y un segundo ligando o una pluralidad de segundos ligandos acoplados a un marcador detectable para su unión a una molécula diana; o, seleccionar un primer ligando o una pluralidad de primeros ligandos y un segundo ligando o una pluralidad de segundos ligandos acoplados a un marcador detectable para su unión a una molécula diana;

10 cribar una muestra que contiene la molécula diana específica en un ensayo de cribado de alto rendimiento que comprende las etapas de: (i) añadir un primer y un segundo ligando, teniendo cada uno un primer y un segundo marcador detectable, (ii) unir el primer y el segundo ligando a sitios separados y específicos de una molécula diana específica, en el que el ensayo de cribado no requiere la etapa de (iii) lavado;

15 detectar una emisión de luz cuando el primer y el segundo ligando se unen específicamente a la molécula diana específica; por lo tanto, identificar y cuantificar la molécula diana específica en una muestra, en el que la molécula diana específica se selecciona entre una glicoproteína, una lipoproteína, un lípido, un fragmento de proteína, una proteína, fragmentos de proteína, péptidos, un péptido, un ácido nucleico, un ácido nucleico péptido y macromoléculas sintéticas o naturales.

2. Un procedimiento de cribado de un compuesto terapéutico candidato que comprende:

20 cribar una muestra que contiene una molécula diana específica en un ensayo de cribado de alto rendimiento que comprende las etapas de: (i) poner en contacto la muestra con el compuesto terapéutico candidato; (ii) añadir un primer y un segundo ligando, teniendo cada uno un primer y un segundo marcador detectable, (iii) unir el primer y el segundo ligando a sitios separados y específicos de una molécula diana específica, en el que el ensayo de cribado no requiere la etapa de (iv) lavado;

25 detectar una emisión de luz cuando el primer y el segundo ligando se unen específicamente a la molécula diana específica; seleccionar el/los compuesto/s que modula/n la cantidad de la molécula diana en comparación con un control, por lo tanto, cribar un compuesto terapéutico candidato.

3. Un procedimiento de cuantificación de una proteína específica en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

30 colocar la muestra que contiene la molécula diana específica en un receptáculo que permita la irradiación de la muestra a una longitud de onda adecuada para excitar el fluoróforo donante y medir la fluorescencia del fluoróforo aceptor mediante un ensayo de alto rendimiento;

35 añadir un primer ligando que se une a un sitio específico de la molécula diana, en el que el primer ligando se une a un primer fluoróforo (el "fluoróforo donante"); añadir un segundo ligando que se une a un sitio específico de la misma molécula diana distinto de aquel al que se une el primer ligando, en el que el segundo ligando se une a un segundo fluoróforo (el "fluoróforo aceptor"); por lo tanto, no requiere etapas de lavado entre cada etapa;

40 irradiar la muestra que contiene la molécula diana unida a los ligandos a una longitud de onda óptima para excitar el fluoróforo donante y medir la intensidad de la luz emitida por el fluoróforo aceptor; y, cuantificar la proteína específica.

4. Un procedimiento de cribado de un compuesto terapéutico candidato, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

45 colocar la muestra que contiene una molécula diana específica en un receptáculo que permita la irradiación de la muestra a una longitud de onda adecuada para excitar el fluoróforo donante y medir la fluorescencia del fluoróforo aceptor mediante un ensayo de alto rendimiento;

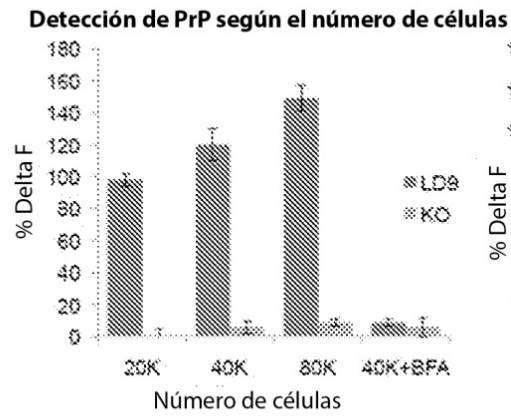
50 poner en contacto la muestra con el compuesto terapéutico candidato; añadir un primer ligando que se une a un sitio específico de la molécula diana, en el que el primer ligando se une a un primer fluoróforo (el "fluoróforo donante"); añadir un segundo ligando que se une a un sitio específico de la misma molécula diana distinto de aquel al que se une el primer ligando, en el que el segundo ligando se une a un segundo fluoróforo (el "fluoróforo aceptor"); en el que el ensayo de cribado no requiere etapas de lavado entre cada etapa;

55 irradiar la muestra que contiene la molécula diana unida a los ligandos a una longitud de onda óptima para excitar el fluoróforo donante y medir la intensidad de la luz emitida por el fluoróforo aceptor; seleccionar el/los compuesto/s que modula/n la cantidad de la molécula diana en comparación con un control; por lo tanto, cribar un compuesto candidato.

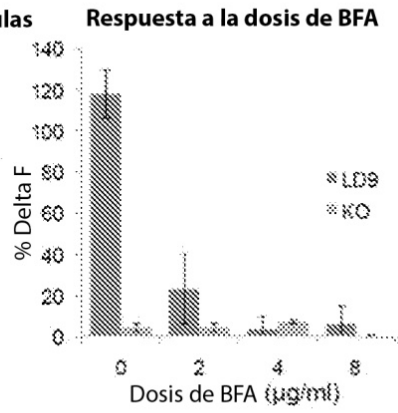


5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el marcador detectable comprende: fluoróforos, moléculas luminiscentes, enzimas o radionucleidos.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que la luz comprende: fluorescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia.
- 5 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procedimiento es un ensayo de cribado de alto rendimiento que comprende un ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET), de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET) o de polarización de fluorescencia.
8. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la molécula diana específica comprende: una glicoproteína, una lipoproteína, un lípido, un fragmento de proteína, una proteína, fragmentos de proteína, péptidos, un péptido, un ácido nucleico, un ácido nucleico peptídico, macromoléculas sintéticas o naturales.
- 10 9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la molécula diana específica está presente en una muestra que comprende: un líquido, un semilíquido, un gel, una muestra biológica, una célula intacta, una célula permeabilizada, una célula interrumpida, un homogeneizado celular, una membrana o un orgánulo celular.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el primer o el segundo ligando comprenden: un polipéptido, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, fragmentos Fv; fragmentos Fv monocatenarios (scFv); fragmentos Fab'; fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanizados; anticuerpos y fragmentos de anticuerpos camelizados, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos, anticuerpos monoespecíficos o biespecíficos, fragmentos Fv estabilizados con disulfuro, tándem de scFv (fragmentos (scFv)), anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, tricuerpos o tetracuerpos, peptoides, aptámeros de péptido o de ácido nucleico, ácidos nucleicos, un aptámero, un peptoide o una fracción de azúcar, miméticos de anticuerpos o combinaciones de los mismos.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que el primer y el segundo ligando son aptámeros de péptido, aptámeros de ácido nucleico o fracciones de azúcar que comprenden glicosaminoglicanos, sulfatos de heparán o sulfatos de condroitina.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la intensidad de la luz emitida se mide mediante fluorimetría de resolución temporal.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la molécula diana no está unida a una superficie de soporte.
14. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la molécula diana está unida a una superficie de soporte.
15. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que la excitación se transfiere al fluoróforo aceptor cuando el fluoróforo aceptor está a una distancia del fluoróforo donante que es igual o menor que la distancia definida por el radio de Förster.
16. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, en el que el receptáculo comprende: una cubeta, placa de varios pocillos, tubo, matraz, disco, perlas, vial, casete, celda de flujo, cartucho, chip microfluídico o combinaciones de los mismos, que permiten la irradiación a la longitud de onda del fluoróforo donante y la medición a la longitud de onda del fluoróforo aceptor.
17. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, en el que el agente terapéutico candidato modula una función, actividad o expresión de una molécula diana según lo medido por la emisión de luz.
18. Un procedimiento de identificación de sujetos con riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno que comprende:
- cribar una muestra biológica de un paciente mediante el procedimiento de la reivindicación 1 o 3;  
identificar y cuantificar un marcador o una molécula que diagnostique la enfermedad o el trastorno en particular;  
e identificar sujetos con riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno.
19. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la molécula diana es la proteína priónica (PrP) o fragmentos de la misma.
20. El procedimiento de la reivindicación 18, en el que la molécula diana es una proteína Tau o fragmentos de la misma.

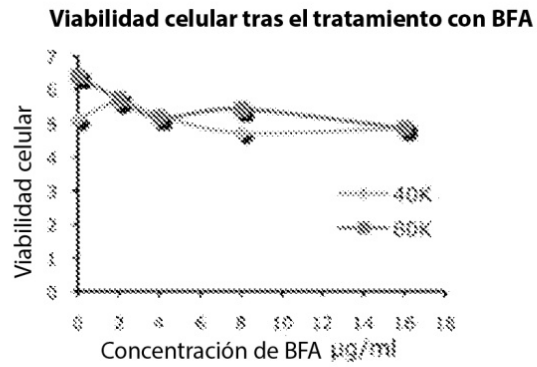
**A.**



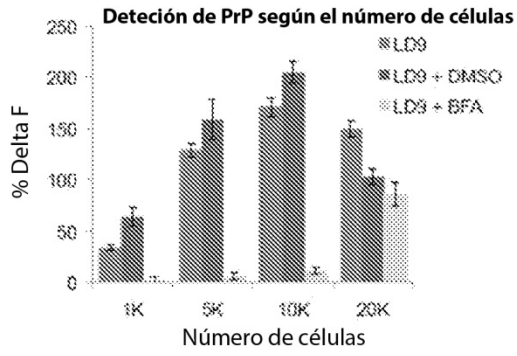
**B.**



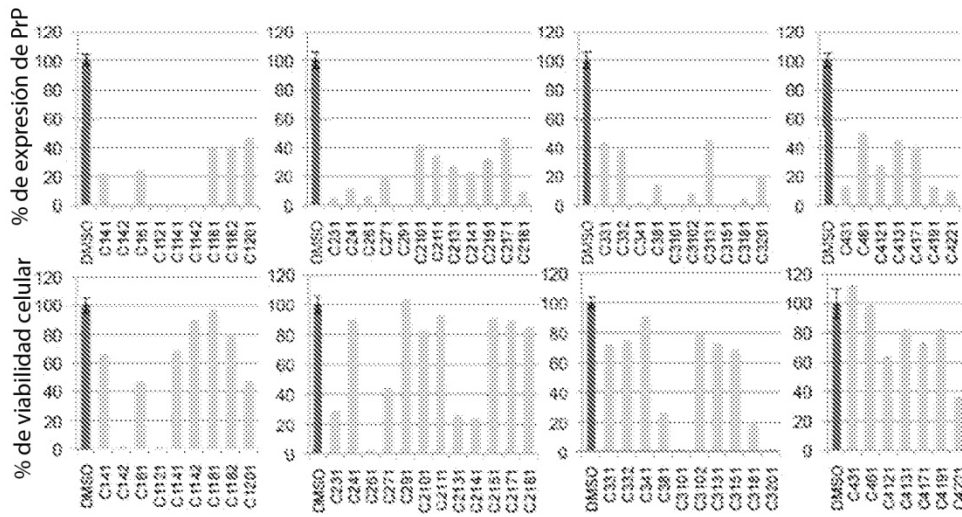
**C.**



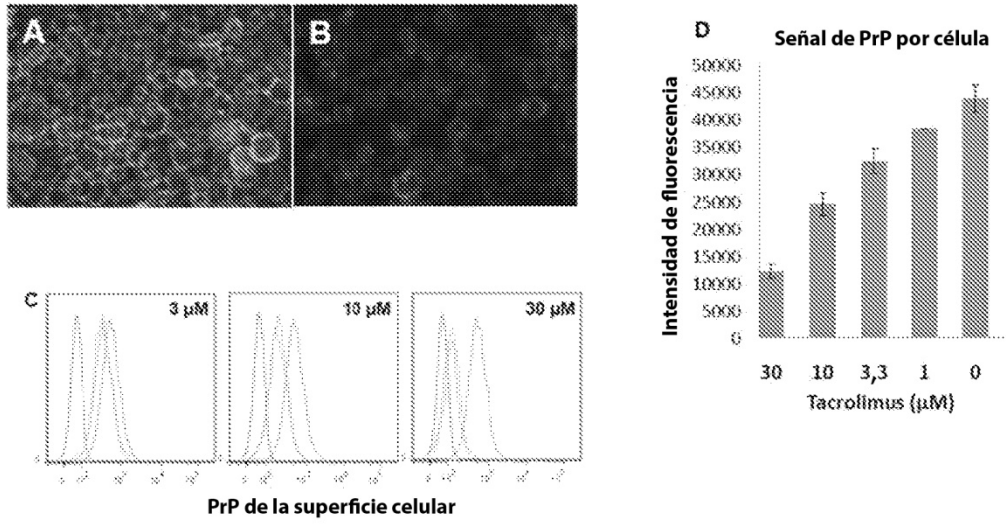
**FIGURAS 1A-1C**



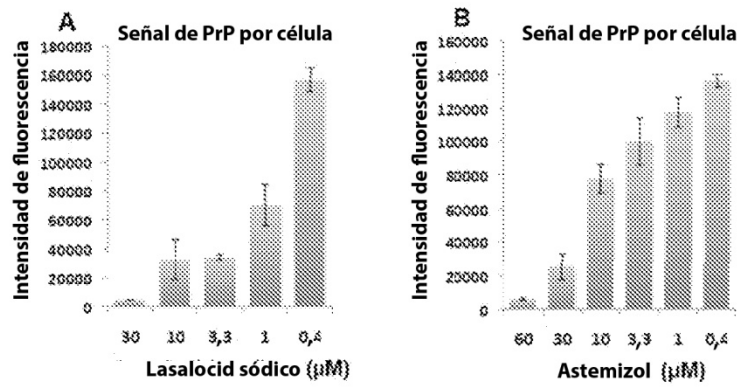
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



FIGURAS 4A-4D



FIGURAS 5A, 5B

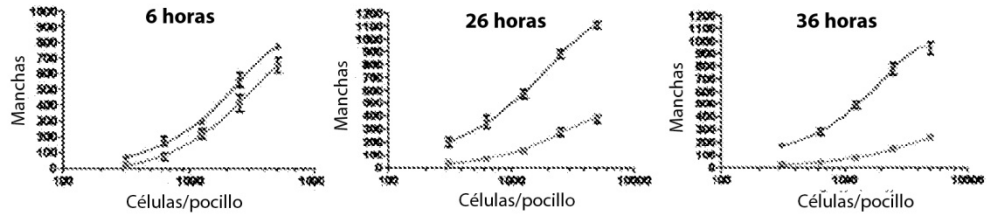
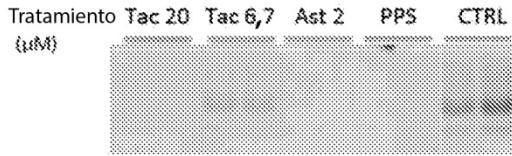


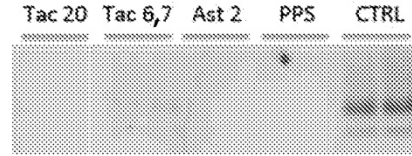
FIGURA 6

**A** Infección por RML de células PK1

9 días después de la infección

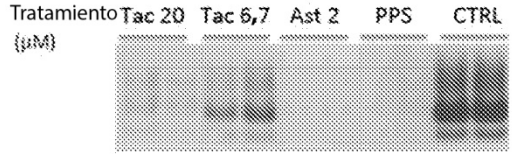


18 días después de la infección (6 días sin tratamiento)

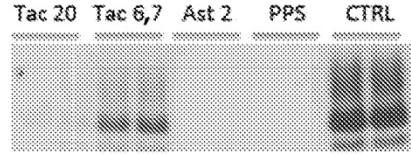


**B** Infección por 22L de células PK1

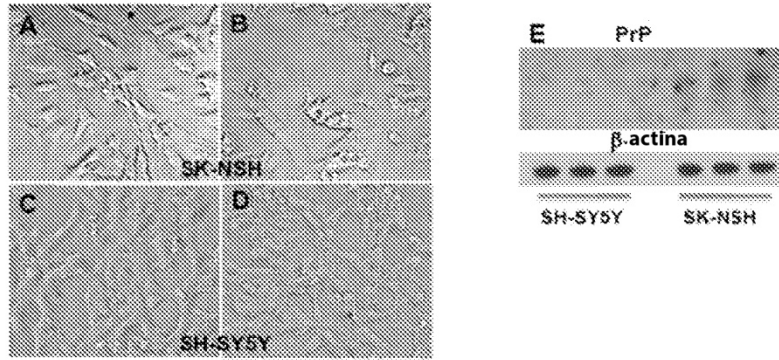
9 días después de la infección



18 días después de la infección (6 días sin tratamiento)



FIGURAS 7A, 7B



FIGURAS 8A-8E