



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 195 778**

② Número de solicitud: 200200759

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: G01N 33/68

G01N 33/50

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **19.03.2002**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2003**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**01.12.2003**

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSITAT AUTONOMA  
DE BARCELONA**  
08193 Bellaterra, Barcelona, ES

⑧ Inventor/es: **Villanueva Cardús, Josep;**  
**Yanes Torrado, Oscar;**  
**Avilés Puivert, Francesc Xavier;**  
**Querol Murillo, Enrique y**  
**Serrano Pubull, Luis**

⑨ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑤ Título: **Procedimiento para la detección de la formación de complejos no covalente biomolécula-ligando.**

⑦ Resumen:

Procedimiento para la detección de la formación de complejos no covalente biomolécula-ligando.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un ligando y una biomolécula; b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula no unible que da lugar a una intensidad de señal de MALDI similar a la de un ligando o biomolécula de la etapa (a); y c) análisis de las preparaciones obtenidas en las etapas (a) y (b) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Dicho procedimiento requiere de cantidades muy pequeñas de material, permite analizar muestras complejas, detecta un amplio rango de masas y presenta una alta reproducibilidad y sensibilidad.

ES 2 195 778 A1

## DESCRIPCION

Procedimiento para la detección de la formación de complejos no covalente biomolécula-ligando.

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la detección de la formación de complejos no covalentes entre biomoléculas y ligandos, tales como proteína-proteína y proteína-molécula no peptídica, mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF. El campo de las interacciones biomoleculares tiene gran interés para el cribado de ligandos candidatos a fármacos así como de dianas previamente no identificadas de ligandos específicos.

**Antecedentes de la invención**

La vida de la célula implica una compleja red de interacciones de biomoléculas, muchas de las cuales pueden ser interesantes como posibles dianas terapéuticas (Lieberman et al., (2001) *Urology*, 57(Soppl1): 4-27; Kuhlmann J. (1999) *Int. J. Clin. Pharmacol*, 37: 575-583). Por ello es de gran interés desarrollar metodologías capaces de identificar interacciones no covalentes en mezclas complejas (Wahler and Reymond (2001) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 5: 152-158; Caporale LH (1995) *Proc. Natl. Acad. Scien.USA*, 92: 75-82). Estas metodologías tienen actualmente una gran importancia para la identificación y validación de moléculas candidatas a fármaco, análisis proteómico, etc. Es también muy importante que las técnicas de cribado puedan automatizarse y robotizarse para poder rastrear gran cantidad de moléculas en poco tiempo, o sea, lo que se denomina cribado de alta eficiencia.

Existen diversas técnicas para detectar la interacción entre un compuesto activo y una biomolécula diana, como por ejemplo la resonancia magnética nuclear. Esta técnica presenta la ventaja de que además de identificar ligandos proporciona información acerca de los grupos químicos involucrados en la interacción. Su principal limitación es la purificación previa de la proteína diana y la alta concentración de la misma requerida en el ensayo (Hadjuk et al., (1999) *J Med Chem* 42: 2315-7; Moore JM (1999) *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 54-8).

Otra metodología es el confocor (Nicoli et al., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4904-4908), la cual permite detectar moléculas en mezclas, siendo necesaria una pequeña cantidad de biomolécula. Su mayor limitación es que requiere el marcado con fluorescencia de una de las biomoléculas y el que ambas tengan que tener diferente masa. Otra técnica es el Biacore, que se basa en la resonancia de superficie de plasmón (Karlsson et al., (2000) *Anal Biochem* 278: 1-13). En esta técnica la molécula diana se debe unir a una superficie sólida. Al unirse una segunda molécula, incrementa la masa de la anterior y esto es detectado por un láser. El principal problema del procedimiento es la necesidad de unión de la molécula diana a una superficie.

Aunque existe algún otro procedimiento para la detección de interacciones entre un compuesto activo y una biomolécula diana, de lo anterior quedan patentes algunos de los principales problemas de estas metodologías, tales como por ejemplo:

1. requerimiento de utilizar una sola molécula aislada en cada ensayo, o
2. la purificación previa de gran cantidad de proteína para rastrear mezclas complejas de ligandos.

Otra de las técnicas que se puede utilizar para el análisis de las interacciones moleculares es la espectrometría de masas. Preferentemente se ha hecho uso de la técnica ESI (electrospray ionisation) y menos de la técnica de Maldi-Tof (matrix assisted laser desorption ionisation time of flight). Algunas de las aproximaciones realizadas mediante la técnica de MALDI-TOF son las siguientes:

- b) mediante una selección previa por cromatografía de afinidad (Zhao et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 4020-4024; Hutchens et al., (1993) *Rapid Comun. Mass Spectrom.* 7: 576-580; Rüdiger et al. (1999) *Anal. Biochem.* 275: 162-170).
- c) mediante entrecruzamiento químico (Rappsilver et al., (2000) *Anal. Chem.* 72: 267-75 Bennett et al., (2000) *Protein Sci.* 9: 1503-18).
- d) mediante proteólisis (Cohen et al., (1995) *Protein Sci.* 4: 1088-1099; Kriwacki and Siuzdak (2000) *Methods Mol Biol* 146: 223-38).
- e) inmovilización de uno de los componentes de la interacción en la membrana de MALDI (Papac et al., *Protein Sci.* (1994) 3: 1485-1492).

f) detección de complejos no covalentes (Glocker et al., (1996) *J Mass Spectrom.* 31: 1221-1227; Farmer and Caprioli (1998) *J Mass Spectrom.* 33: 697-70).

g) ensayo de inmunoafinidad para mapeo de epítomos mediante espectrometría de masas (Kislar and Downard (1999) *Anal. Chem.* 71: 1792-1801).

Sin embargo, la espectrometría de masas Maldi-Tof presenta algunos inconvenientes. Uno de ellos es la baja solubilidad que los péptidos y proteínas presentan en los disolventes habituales de esta técnica, lo que conlleva una detección incompleta de los ligandos. Otro problema de este tipo de técnicas de espectrometría Maldi-Tof, descritas más arriba, es que requieren la inmovilización de la proteína diana a superficies, lo cual da lugar a “artefactos” derivados del proceso de inmovilización y, por tanto, se dificulta la detección de la molécula de interés.

Por tanto, se requieren nuevos procedimientos que sean capaces de identificar una determinada molécula en una mezcla compleja de forma totalmente eficiente, mediante el establecimiento de interacciones intermoleculares.

La presente invención soluciona los problemas técnicos planteados, proporcionando un procedimiento para la detección de la formación de un complejo no covalente biomolécula-ligando que no requiere de la utilización previa de técnicas cromatográficas o de purificación de la muestra a analizar y superando las limitaciones existentes en este campo, como, por ejemplo, la solubilidad de la molécula de interés.

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar la formación de un complejo no covalente entre por lo menos una biomolécula y un ligando, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un ligando y una biomolécula;

b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula no unible, que da lugar a una intensidad de señal MALDI similar a la de dicho ligando y/o biomolécula de la etapa (a); y

c) análisis de las preparaciones obtenidas en las etapas (a) y (b) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

Ventajosamente, la preparación de la etapa (a) puede comprender la molécula no unible de la etapa (b).

La presencia de dicha molécula no unible en la preparación de la etapa (a) permite determinar entre qué ligando y biomolécula se ha establecido la interacción no covalente para dar lugar al complejo.

La preparación de un control (etapa b) en paralelo a la muestra que se quiere analizar (que puede llegar a ser muy compleja, ya que puede comprender un elevado número de biomoléculas y/o ligandos) para descartar artefactos derivados de la adición de la diana o ligando, permite la identificación, en dichas mezclas complejas y en diferentes condiciones, la formación de complejos no covalentes de biomolécula-ligando mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF.

En la etapa (c) el análisis consiste en la obtención de los correspondientes espectros de masas MALDI de una muestra de la etapa (a), en donde existirá interacción y, muestra de la etapa (b), control, en la que no habrá interacción. Las diferencias entre ambos espectros se distinguen por comparación visual y numérica (área de los picos), aunque el procedimiento es fácilmente automatizable. Una disminución relativa de la intensidad iónica, o la ausencia de la señal iónica de un a biomolécula o ligando, entre las muestras obtenidas en las etapas (a) y (b), puede ser atribuida a la interacción, no covalente, entre, por lo menos, un ligando y una molécula diana.

En la presente invención, por “molécula no unible” se entiende cualquier molécula que no tenga afinidad para unirse a una biomolécula y/o ligando.

En la presente invención, por “complejo no covalente” se entiende la estructura molecular resultante de la interacción entre por lo menos una biomolécula y un ligando, siendo dicha interacción de naturaleza no covalente. Ejemplos de interacciones no covalentes son los puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, etc.

## ES 2 195 778 A1

En una realización de la presente invención, dicho procedimiento permite estimar la afinidad entre por lo menos una biomolécula y un ligando.

En otra realización preferida, dicha biomolécula es una molécula candidata a diana terapéutica.

En aún otra realización preferida, dicho ligando es un candidato a fármaco.

En la presente invención, por “biomolécula o molécula candidata a diana o molécula diana” se entiende cualquier entidad molecular para la que sea deseable diseñar ligandos. Ejemplos de biomoléculas diana son las proteínas, péptidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, moléculas de señalización y moléculas orgánicas, y más específicamente, en el caso de las aplicaciones farmacéuticas, proteínas receptoras, enzimas, hormonas, factores de crecimiento y ácidos nucleicos, entre otros.

Por otro lado, en la presente invención, por “ligando”, o “ligandos candidatos”, se entienden aquellas moléculas o conjuntos de moléculas presentes en la mezcla de reacción y candidatos a interactuar con la o las “biomoléculas o moléculas candidatas a diana”. Ejemplos de “ligando” o “ligandos candidatos”, son los péptidos, polipéptidos, proteínas, oligonucleótidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos, hormonas, factores de crecimiento, moléculas orgánicas, sustratos enzimáticos, naturales o modificados, enzimas y receptores.

El tipo de ligando generalmente dependerá de la naturaleza de la molécula diana. Por ejemplo, en la búsqueda de ligandos para una molécula diana proteica, una mezcla de ligandos candidatos puede ser una mezcla de péptidos, polipéptidos, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, sustratos enzimáticos naturales o modificados, receptores, moléculas miméticas estructurales o funcionales o DNA. Las moléculas que son, con más probabilidad, los ligandos más efectivos en un contexto biológico y con objetivos farmacéuticos, son aquellas moléculas que se unen a una proteína e inhiben o anulan su actividad biológica normal, sin inducir ninguna reacción biológica adversa al unirse. Sin embargo, también pueden ser ligandos efectivos aquellos que, en lugar de una inhibición, den lugar a una activación de la molécula diana.

En el caso de que la molécula diana sea un ácido nucleico, las mezclas de ligandos candidatos incluyen mezclas de péptidos, polipéptidos, proteínas que se unen a ácidos nucleicos, fragmentos de tales proteínas o mezclas de moléculas de ácidos nucleicos (como son las mezclas de oligonucleótidos). Estas mezclas de ácidos nucleicos pueden ser preparadas por síntesis química, provenir de genotecas de cDNA, obtenidas de un organismo biológico, etc.

La naturaleza de la mezcla de ligandos candidatos puede también variar, dependiendo de los requisitos del sistema en particular. Por ejemplo, en las fases iniciales de la investigación de un ligando candidato apropiado se puede utilizar una amplia mezcla de diferentes compuestos, como una librería peptídica combinatorial, una librería química o una mezcla de productos naturales. En posteriores fases del desarrollo, puede ser más apropiado una investigación más refinada, por ejemplo, una librería que contenga diferentes formas mutadas de un ligando candidato que ha mostrado propiedades interesantes en los estudios de interacción iniciales.

El procedimiento de la presente invención permite el cribado de por lo menos un ligando que es capaz de interactuar con una biomolécula diana de particular interés.

Para el cribado de dichos ligandos se siguen las etapas mencionadas anteriormente, en particular:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un ligando candidato y una biomolécula que es una posible diana.

b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula de características tales que da lugar a una intensidad de señal de MALDI similar a la del o los ligandos candidatos, pero que no se una(n) a la molécula diana, de esta forma servirá(n) de referencia en el posterior análisis por espectrometría de masas. (En el apartado de “Ejemplos” se describen diversos ejemplos de moléculas de este tipo).

c) analizar una muestra de cada una de las preparaciones obtenidas en las etapas anteriores mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

## ES 2 195 778 A1

Las diferencias entre ambos espectros se distinguen por comparación visual y numérica (área de los picos), aunque el procedimiento es fácilmente automatizable. Una disminución relativa de la intensidad iónica, o la ausencia de la señal iónica de algún componente, candidato a ligando, entre las muestras control y muestra con molécula diana presente, puede ser atribuida a la interacción entre el ligando y la molécula diana.

Es destacable que el procedimiento de la presente invención es igualmente útil en la identificación de moléculas diana que se unan a un ligando conocido. En este sentido, los términos “ligando” y “molécula diana” serían intercambiables. Si en vez del ligando se trata de encontrar la molécula diana no es necesario conocer las masas de los ligandos, siendo el único pre-requisito que las masas de los ligandos sean diferentes de la de la molécula diana. De forma similar, varias moléculas diana pueden ser analizadas simultáneamente, siempre que tengan diferentes masas.

De la misma manera, el procedimiento de la presente invención permite el cribado de una biomolécula, preferiblemente de una diana candidata a diana.

En particular, dicho procedimiento de cribado de una biomolécula se basa en la interacción con por lo menos un ligando de interés, utilizándose ligandos específicos previamente seleccionados, y para el control moléculas diana de características apropiadas pero que no interaccionen con el mencionado ligando específico. Dicho procedimiento comprende las etapas:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un candidato a molécula diana y por lo menos una molécula ligando específica de la molécula diana.

b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula de características tales que dé lugar a una intensidad de señal de MALDI similar a la de la o las moléculas diana candidatas, pero que no se una(n) a la(s) molécula(s) ligando, de esta forma servirá(n) de referencia en el posterior análisis por espectrometría de masas.

c) analizar una muestra de cada una de las mencionadas disoluciones mediante espectrometría de masas.

Las diferencias entre ambos espectros se distinguen por comparación visual y numérica (área de los picos), aunque el procedimiento es fácilmente automatizable. Una disminución relativa de la intensidad iónica, o la ausencia de la señal iónica de algún componente, candidato a molécula diana, entre las muestras control y muestra con moléculas ligando presentes, puede ser atribuida a la interacción entre el ligando y la molécula diana candidata.

En una realización preferida, dicha biomolécula es una proteína o ácido nucleico, preferiblemente se selecciona entre tripsina, cisteín proteasa, papaína, carboxipeptidasa A o un fragmento de las mismas.

En otra realización preferida, dicho ligando es una molécula de RNA, una molécula de DNA, un nucleótido, una proteína, un péptido, un anticuerpo, un compuesto químico orgánico o un fármaco.

En aún otra realización preferida, dicho ligando puede ser una librería de RNA, una librería de DNA, una librería de nucleótidos, una librería de proteínas, una librería de péptidos, una librería de anticuerpos, una librería de presentación de fago o una librería de moléculas fármaco.

En otra forma de realización de la presente invención se describe una forma de estimar la afinidad entre las moléculas del complejo de interacción, mediante la comparación, tanto visual como cuantitativa. El procedimiento es simple y fácilmente automatizable.

El procedimiento de la presente invención presenta, entre otras, las siguientes ventajas:

- cantidad de proteína necesaria para el ensayo (pmol);
- obtención simultánea de la masa de diversos ligandos que están interaccionando;
- posibilidad de analizar mezclas complejas;
- detección del complejo en disolución;
- amplio rango de masa detectado;

- reproducibilidad de señal y sensibilidad.
- estimación cuantitativa de la afinidad de la interacción entre la molécula diana y el ligando.
- 5 - identificación de un ligando de una molécula diana determinada, así como de una diana, previamente no identificada, para un ligando específico.
- rapidez y bajo coste económico de este procedimiento.

Además, el procedimiento descrito en la presente invención permite identificar ligandos candidatos a compuestos cabezas de serie útiles para posibles fármacos o en diagnóstico, animal y humano. Por ejemplo, un ligando identificado de acuerdo con la invención puede ser utilizado para posterior análisis y diseño químico o “in silico”, con objeto de refinar sus propiedades de unión, farmacocinéticas, solubilidad, administración oral, etc. En un aspecto de la invención, el ligando o ligandos identificados en un ciclo de selección pueden ser mutados o modificados para crear una segunda mezcla o librería de candidatos, a su vez base de otro posterior ciclo de rediseño, y así sucesivamente en ciclos iterativos de selección y mutación/modificación. En otros casos el ligando candidato identificado puede ser útil en aplicaciones terapéuticas.

En una realización preferida de la presente invención, el ligando identificado siguiendo el procedimiento más arriba descrito se puede utilizar como un medicamento.

En otra realización de la presente invención, la biomolécula identificada siguiendo el procedimiento más arriba descrito se puede utilizar como un medicamento.

Los ligandos y biomoléculas identificados de acuerdo con el procedimiento de la invención, se pueden utilizar con fines terapéuticos. De hecho, es un objeto de la presente invención una composición que comprende por lo menos un ligando identificado según el procedimiento descrito más arriba, para utilizar como medicamento.

Otro objeto de la presente invención, es una composición que comprende por lo menos una biomolécula identificada según el procedimiento más arriba descrito para utilizar como medicamento.

Otro aspecto de la presente invención es facilitar la determinación de la “cantidad terapéutica efectiva” (la cantidad de agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o condición, o que muestra un efecto terapéutico o preventivo detectable). La cantidad terapéutica efectiva precisa para un sujeto en una determinada situación puede ser determinada experimentalmente y es a juicio del médico clínico. Típicamente van desde 0,01 mg/kg a 50 mg/kg de ligando candidato/kg de peso del sujeto. Para administrarlo al paciente, el ligando candidato puede ser administrado junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables son generalmente agua, disolución salina, glicerol, etanol, y opcionalmente también pueden contener sales de ácidos minerales como cloruros, bromuros, fosfatos, sulfatos, sales de ácidos orgánicos como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, etc. De la misma manera, pueden haber sustancias auxiliares, tales como humectantes, emulsificantes, tampones, etc.

Igualmente, pueden contener transportadores, que no den lugar a producción de respuesta inmune dañina, tales como macromoléculas grandes y de lenta metabolización (proteínas, polisacáridos, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, látex, e incluso virus inactivos).

Del mismo modo existen otros procedimientos de administración, como por ejemplo ácidos nucleicos en vectores de expresión apropiados, DNA condensado con policationes, unido o no a virus u otros ligandos.

Además, el procedimiento de la presente invención permite identificar ligandos de interés en otros campos diferentes de la clínica humana o animal. Por ejemplo para la identificación de interacciones de interés en investigación pura o aplicada, en organismos animales, vegetales, microorganismos, etc; así como para el procedimiento de análisis de interacciones en el campo de la proteómica, ingeniería metabólica, etc.

## Figuras

60 Figura 1A. Espectro de masas MALDI de una mezcla de BPTI y un control no unible (PCI) antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con tripsina. Los picos adicionales corresponden

a la autólisis de la tripsina.

Figura 1B. Espectro de masas MALDI de una mezcla de Stefin A y un control no unible (LCI) antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con papaína. Los picos adicionales corresponden a la heterogeneidad de la Stefin A.

Figura 1C. Espectro de masas MALDI de una mezcla de LCI y un control no unible (insulina) antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con CPA. La insulina se añadió como control no unible así como sustrato de la CPA, lo que demuestra que la CPA es enzimáticamente activa y que posibles sustratos no se unen a las proteasas.

Figura 2. Espectro de masas MALDI de una mezcla de PCI,  $\Delta$ 3PCI y un control no unible (insulina) antes (arriba) y después (abajo) de la reacción con CPA.

Figura 3A. Espectro de masas MALDI de una mezcla de Antipain y un control no unible (somatostatina) antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con papaína.

Figura 3B. Espectro de masas MALDI de una mezcla de E64 y un control no unible (3BP2) antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con la papaína. Los picos adicionales corresponden a aductos producidos a partir de los compuestos de la matriz.

Figura 4. Espectro de masas MALDI de una mezcla de RNasa y un control no unible (ADA2h) antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con el RNA total. Los picos adicionales corresponden a aductos producidos por los componentes de la matriz.

Figura 5. Espectro de masas MALDI de un extracto de *Stichodactyla helianthus* antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la mezcla con tripsina. Se puede observar la aparición de un pico adicional a 4546m/z tras la reacción con tripsina, debido a la autólisis de la tripsina.

Figura 6. Espectro de masas MALDI de un extracto de *Stichodactyla helianthus* antes (espectro superior) y después (espectro central) de la reacción con carboxipeptidasa A. El espectro inferior corresponde a un espectro de masas MALDI de un extracto de *Stichodactyla helianthus* después de la reacción con CPA y la adición de inhibidor de carboxipeptidasa en exceso molar.

Figura 7. Espectro de masas MALDI de una mezcla de la molécula de inhibidor de CPA de *Stichodactyla helianthus* y el control no unible antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con CPA.

## Ejemplos

A continuación se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo, ejemplos de realizaciones preferidas de la invención.

En los ejemplos detallados a continuación se sigue el procedimiento general descrito en el apartado “Descripción de la Invención”. En todos los ejemplos descritos ambas muestras, o preparaciones, son portadoras de molécula ligando y molécula control (molécula de referencia que no se une a la molécula diana pero que da lugar a una intensidad de señal de MALDI similar), pero tan sólo en una de ellas está presente la molécula diana, y se produce la reacción entre ésta y el ligando. El complejo ligando-molécula diana formado es entonces detectado por la disminución de la intensidad de la señal de la molécula ligando en el espectro de masas MALDI, mientras que dicha intensidad resulta inalterada en el espectro obtenido en ausencia de molécula diana. Las diferencias entre ambos espectros se distinguen por comparación visual. Una disminución relativa de la intensidad iónica, o la ausencia de la señal iónica de algún componente, candidato a ligando, de la muestra que está presente en el control puede ser atribuida a la unión de esa molécula a la diana. Como puede observarse en las figuras, las restantes señales iónicas observadas son relativamente poco afectadas por la presencia o ausencia de la molécula diana. Las diferencias también pueden ser cuantificadas midiendo las áreas de los picos antes y después de la reacción con las moléculas diana.

En una de las realizaciones, se ha detectado la formación de complejos proteína-proteína (proteasas e inhibidores proteicos), proteína y molécula no peptídica (proteasas e inhibidores no proteicos), proteína y ácido nucleico (RNasa y ADA2h).

En otra de las realizaciones de dicho procedimiento, se ha detectado la formación de complejos no covalentes en muestras complejas. Como ejemplo se describe la identificación de inhibidores de proteasas a partir de extractos de animales marinos, y específicamente la identificación de un nuevo inhibidor de carboxipeptidasa

5 A partir de una serie de ensayos se determinó que la composición apropiada del disolvente de la matriz para realizar el espectro de masas MALDI es de 1/1 (v/v) disolvente orgánico/agua desionizada.

10 Para la preparación de la muestra para realizar el espectro de masas MALDI se utilizó el procedimiento estándar de la gota secada, si bien en los casos en que se analizaron mezclas complejas, se han utilizado procedimientos alternativos, tales como capa fina, sándwich o una modificación del sándwich en que no se deja secar la gota antes del lavado, siendo éste último el que ha proporcionado los mejores resultados (Kussmann et al., (1997) J. Mass Spectrom., 32: 593-601). En los ejemplos descritos, a continuación, las matrices MALDI utilizadas fueron una disolución de 10 mg/mL de ácido sinápico (de Fluka) en acetonitrilo/agua 1/1 (v/v) o bien una disolución conteniendo 10 mg/mL de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxycinnámico (HCCA) en acetonitrilo/agua 1/1 (v/v) (Aldrich Chemical Co.).

15 Los espectros de masas MALDI fueron obtenidos en un espectrómetro de masas Bruker Biflex TOF equipado con láser de nitrógeno con una longitud de onda de emisión de 337nm. Los espectros fueron obtenidos en modo lineal, a un voltaje de aceleración de 19 KV. Se utilizó deflexión de los iones de baja masa con objeto de aumentar la señal de la proteína diana. Los espectros fueron obtenidos promediando 50-100 impactos.

#### Ejemplo I

25 *Detección de la formación de un complejo no covalente proteína-proteína. Determinación de la afinidad de la interacción entre moléculas*

30 Las interacciones entre proteasas y sus inhibidores son un buen modelo para poner a punto el procedimiento. Se han escogido tres inhibidores de diferentes clases de proteasas: el inhibidor bovino de tripsina o BPTI (figura 1A) (de Aldrich Chemical Co ), Stefin A (figura 1B) (proporcionada por el Dr. H. Fritz, Universidad de Munich) y el inhibidor de carboxipeptidasa proveniente de sanguijuela, LCI (figura 1C) (obtenido de acuerdo con Reverte et al. (1998) J. Biol. Chem., 273: 32927-32933) que inhiben respectivamente a la serin proteasa, la cistein proteasa y la carboxipeptidasa (a partir de ahora CPA).

35 Los tres ligandos son inhibidores que se unen fuertemente a sus respectivas proteasas, con constantes de inhibición ( $K_i$ ) entre  $10^{-9}$  y  $10^{-13}$  M.

40 Los inhibidores se diluyeron en agua desionizada hasta una concentración de 50  $\mu$ g/mL. Las proteasas se diluyeron en agua desionizada hasta una concentración molar de 5 veces superior a la del correspondiente inhibidor.

45 La molécula no unible utilizada, en cada caso para la preparación de la disolución control, fue: el inhibidor de carboxipeptidasa proveniente de patata, PCI (figura 1A), LCI (figura 1B) e insulina (figura 1C).

Los productos somatostatina, insulina, Antipain, carboxipeptidasa A y tripsina fueron obtenidos de la casa Sigma.

50 Cada una de las soluciones de la molécula no unible se diluyó con agua desionizada a una concentración molar tal que, empíricamente, daba lugar a una intensidad similar de MALDI MS a la del inhibidor de proteasa ensayado.

55 La disolución control se obtuvo mezclando 0,5  $\mu$ L de la disolución de la molécula no unible (obtenida previamente), 0,5  $\mu$ L de agua desionizada y 0,5-1,0  $\mu$ L de inhibidor de proteasa.

La disolución problema (en la que se desea determinar la formación del complejo no covalente) se obtuvo mezclando 0,5-1,0  $\mu$ L de inhibidor de proteasa, 0,5  $\mu$ L de la disolución que comprende la molécula no unible y 0,5  $\mu$ L de la disolución de proteasa específica del inhibidor.

60 Tanto la disolución control como la disolución problema se incubaron durante 3 minutos, a temperatura ambiente, antes de realizar las mediciones mediante espectrometría Maldi-Tof.

Las figuras 1A, 1B y 1C muestran los espectros de masas MALDI correspondientes a las reacciones de formación de cada uno de los complejos, mostrando, cada una de las figuras cada una de las moléculas problema (inhibidor de proteasas) antes y después de su reacción con la molécula diana (proteasa).

5

El procedimiento permite una estimación de la afinidad de unión entre las moléculas que interactúan. Para demostrarlo se tomó inhibidor de carboxipeptidasa A ( $K_i = 1,5 \times 10^{-9}$  M) así como un mutante,  $\Delta 3$ PCI (obtenidos de acuerdo con Molina et al., (1992) Gene, 116:129-138 y Marino-Buslje et al., Eur. J. Biochem. (2000) 267,1502-1509 respectivamente), de este inhibidor ( $K_i = 40 \times 10^{-6}$  M) y se hicieron reaccionar simultáneamente, y a la misma concentración (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con carboxipeptidasa A. La metodología seguida para la preparación de las soluciones y condiciones a lo largo de la espectrometría de Maldi-Tof son las mismas que las descritas más arriba, excepto la concentración de carboxipeptidasa A que fue 10 veces menor.

15

La Figura 2 muestra los espectros de MALDI correspondientes a las dos moléculas problema (inhibidor y mutante) antes (espectro superior) y después (espectros medio e inferior) de la reacción con la molécula diana (carboxipeptidasa A). La comparación, tanto visual como cuantitativa, muestra que la disminución de las intensidades iónicas del espectro son proporcionales con las constantes de afinidad previamente obtenidas (Tabla I y Marino-Buslje et al., Eur. J. Biochem. (2000) 267,1502-1509).

20

#### Ejemplo II

##### *Detección de la formación de un complejo proteína-molécula no peptídica*

25

Para determinar la interacción entre proteína y molécula no peptídica se han utilizado dos pequeños inhibidores orgánicos de proteasas, Antipain (de la cysteinil proteasa papaína) y trans-Epoxysuccinyl-L-Leucilamido-(4-Guanidino)Butane (denominado a partir de ahora E-64), de la empresa Sigma.

30

El Antipain se resuspendió en agua a una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el E-64 se disolvió en DMSO hasta 1,42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para posteriormente diluirlo en agua desionizada hasta una concentración final de 0,28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La molécula diana fue papaína.

35

La molécula no unible fue la somatostatina (para el Antipain) y el péptido 3BP2 (para E-64). 3BP2 se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito por Viguera et al (1994) Biochemistry, 33:10925-10933.

La metodología seguida para obtener las soluciones control y problema, así como los espectros por Maldi-Tof, es la misma que la descrita en el Ejemplo 1.

40

La Figura 3A muestra el espectro MALDI del inhibidor Antipain antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la adición de papaína. Puede observarse que la intensidad de la señal del inhibidor Antipain se reduce en presencia de la proteasa (Tabla I).

45

La Figura 3B muestra el espectro MALDI del inhibidor E-64 antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la adición de papaína. Puede observarse que la intensidad de la señal del inhibidor E-64 casi desaparece del espectro en presencia de la proteasa (Tabla I). En dicha figura pueden observarse una serie de picos de baja intensidad que corresponden a ruido de fondo de la propia matriz utilizada en esta espectrometría.

50

#### Ejemplo III

##### *Detección de la formación de un complejo proteína-ácido nucleico*

55

Las proteínas que se unen a sitios específicos de los ácidos nucleicos representan un reto y un problema interesante desde los comienzos de la biología molecular. La detección de tales complejos permitiría identificar proteínas envueltas en muchos procesos celulares importantes.

Como modelo se ha escogido la interacción entre la RNasa y el RNA.

60

En la unión de ambas moléculas puede estar involucradas interacciones electrostáticas entre los grupos fosfato del RNA y aminoácidos básicos (Lys o Arg) de la proteína, así como interacciones específicas entre

## ES 2 195 778 A1

las bases nitrogenadas y aminoácidos del sitio activo o en posiciones adyacentes (Nogués et al. (1998) Cell Mol. Life Sci., 54: 766-774).

Para ello se disolvió una muestra liofilizada de RNasa A de páncreas bovino (Roche) en Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, hasta una concentración de 1 mg/mL.

El RNA total se extrajo de *E. coli* mediante el kit Ultraspec RNA (BIOTECX Laboratory).

La molécula no unible fue el péptido ADA2h, que se obtuvo de acuerdo con el procedimiento descrito por Viguera et al. (1997) Folding and Design, 2:23-33.

La metodología seguida para la obtención de la disolución problema y control, es la misma que la descrita en el Ejemplo 1.

La Figura 4 muestra el espectro MALDI de RNasa A antes de la interacción (espectro superior) y después de interaccionar con el RNA total de *E. coli* (espectro inferior). Puede observarse que la intensidad de la señal de la RNasa en el espectro de masas se reduce debido a la formación del complejo RNA-RNasa.

### Ejemplo IV

#### *Detección de la formación de un complejo no covalente en muestras complejas*

A partir de extractos de organismos marinos se determinó la presencia de inhibidores específicos de proteasas.

Los organismos marinos, especialmente las anémonas, han resultado ser una fuente importante de moléculas bioactivas como citolisinas, cardiotoxinas, neurotoxinas, inhibidores de proteasas, etc (Lanio et al., (2001) Toxicon, 39: 187-194).

Se tomaron extractos enteros de la anémona *Stichodactyla helianthus* y se disolvieron en agua desionizada hasta una concentración de 20 mg/mL. esta disolución se centrifugó a 8000xg durante 10 min. El sobrenadante se lavó y concentró en péptidos y pequeñas proteínas mediante una cromatografía en fase reversa de acuerdo con un procedimiento estándar descrito anteriormente (Villanueva et al., (2001) Enzyme Microb. Technol., 29: 99-103).

Las moléculas unidas a la resina se eluyeron con isopropanol, y fueron liofilizadas y resuspendidas en agua desionizada.

De esta suspensión se tomó 1  $\mu$ L y se mezcló con 0,5  $\mu$ L de agua desionizada, obteniéndose así la disolución control, o con 0,5  $\mu$ L de Carboxipeptidasa A o de Tripsina (obteniéndose las soluciones problema), e incubadas durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizó la espectrometría Maldi-Tof (según lo expuesto más arriba) para la disolución control y para cada una de las soluciones problema (extracto de anémona-carboxipeptidasa A y extracto de anémona-tripsina).

La Figura 5 muestra el espectro de masas MALDI correspondiente al extracto de la anémona *Stichodactyla helianthus* antes (espectro superior) y después (espectro inferior) de la reacción con tripsina. Puede observarse que tras la reacción con tripsina, uno de los picos del espectro MALDI, con una masa molecular de 6110 m/z, fue identificado como el inhibidor kunitz de proteasas Sph1 (Delfin et al., (1996) Toxicon, 34: 1367-1376 and (1998) J. Mass Spectrom., 33: 697-704).

La Figura 6 muestra el mismo extracto de anémona antes de la interacción con CPA (espectro superior) y después de la interacción con la Carboxipeptidasa A (CPA) (espectro superior). En este caso puede observarse que tras la reacción con la CPA, uno de los picos del espectro MALDI, con una masa molecular de 3484, desaparece del espectro. Para confirmar que este ión corresponde a un nuevo inhibidor de CPA se realizó un ensayo de competición con el inhibidor de carboxipeptidasa procedente de patata (a partir de ahora PCI), un inhibidor proteico. Tras la reacción con la CPA, se le añadió al extracto un exceso de PCI.

En la Figura 6, en particular, en el espectro inferior, puede observarse que debido a la competencia

## ES 2 195 778 A1

entre el inhibidor endógeno y el PCI en exceso, el inhibidor endógeno es desplazado de la CPA y vuelve a ser visible en el espectro MALDI. Con objeto de verificar la interacción de este nuevo inhibidor con la CPA se aisló mediante dos cromatografías en fase reversa y se realizó un ensayo de interacción con la CPA, tal y como ha sido descrito anteriormente.

5

La Figura 7 muestra el espectro de masas correspondiente a la molécula antes y después de la reacción con la CPA, pudiéndose comprobar que este inhibidor forma un complejo específico con la CPA, tanto en una muestra compleja como purificada.

10

TABLA 1

*Áreas relativas de los picos en los espectros de masa para los inhibidores de proteasas y sus respectivos controles no unibles antes (-) y después (+) de reaccionar con las proteasas diana*

15

Par proteasa-inhibidor de proteasa	Control no unible	Inhibidor de proteasa	Control no unible	Inhibidor de proteasa
	- proteasa		+ proteasa	
LCI-CPA	100%	100	100%	3%
BPTI-TRIPSINA	100%	138%	100%	2%
STEFIN A-PAPAÍNA	100%	141%	100%	26%
ANTIPAIN-PAPAIN	100%	152%	100%	12%
E64-PAPAÍNA	100%	112%	100%	6%
EXTRACTO-TRIPSINA	100%	65%	100%	6%
EXTRACTO-CPA	100%	99%	100%	7%
NUEVO INHIBIDOR DE CPA-CPA	100%	110%	100%	0%

55

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la formación de un complejo no covalente entre por lo menos una biomolécula y un ligando, **caracterizado** por el hecho de que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un ligando y una biomolécula;

b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula no unible que da lugar a una intensidad de señal de MALDI similar a la de un ligando o biomolécula de la etapa (a); y

c) análisis de las preparaciones obtenidas en las etapas (a) y (b) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que comprende una etapa (d) que consiste en estimar la afinidad entre por lo menos dicho ligando y dicha biomolécula mediante la comparación visual o numérica de la intensidades iónicas de los espectros obtenidos en la etapa (c).

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que comprendiendo las etapas de:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un ligando candidato y una biomolécula que es una posible diana;

b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula no unible que da lugar a una intensidad de señal de MALDI similar a la de dicho ligando candidato; e

c) identificación de dicho ligando candidato mediante el análisis de una muestra de cada una de las preparaciones obtenidas en las etapas (a) y (b) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

4. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por el hecho de que comprendiendo las etapas de:

a) preparación de una disolución que comprende por lo menos un candidato a molécula diana y por lo menos una molécula ligando específica de la molécula diana;

b) preparación de una disolución control que comprende por lo menos una molécula no unible que dé lugar a una intensidad de señal de MALDI similar a la de dicha molécula diana candidata; e

c) identificación de dicha molécula diana mediante el análisis de una muestra de cada una de las disoluciones obtenidas en las etapas (a) y (b) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dicha biomolécula es una proteína o un ácido nucleico.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que dicho ligando se selecciona de entre el grupo formado por: molécula de RNA, una molécula de DNA, un nucleótido, una proteína, un péptido, un anticuerpo, un compuesto químico orgánico.

7. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 4, **caracterizado** por el hecho de que dicho ligando comprende una librería de RNA, una librería de DNA, una librería de nucleótidos, una composición de proteínas, una librería de péptidos, una librería de anticuerpos.

8. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** por el hecho de que dicha biomolécula es tripsina, cistein proteasa, papaína, carboxipeptidasa A o un fragmento de las mismas.

9. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** por el hecho de que dicho ligando es un inhibidor de proteasas BPTI, Antipain, E-64, LCI, PCI o alguno procedente de extractos de la anémone *Stichodactyla helianthus*.

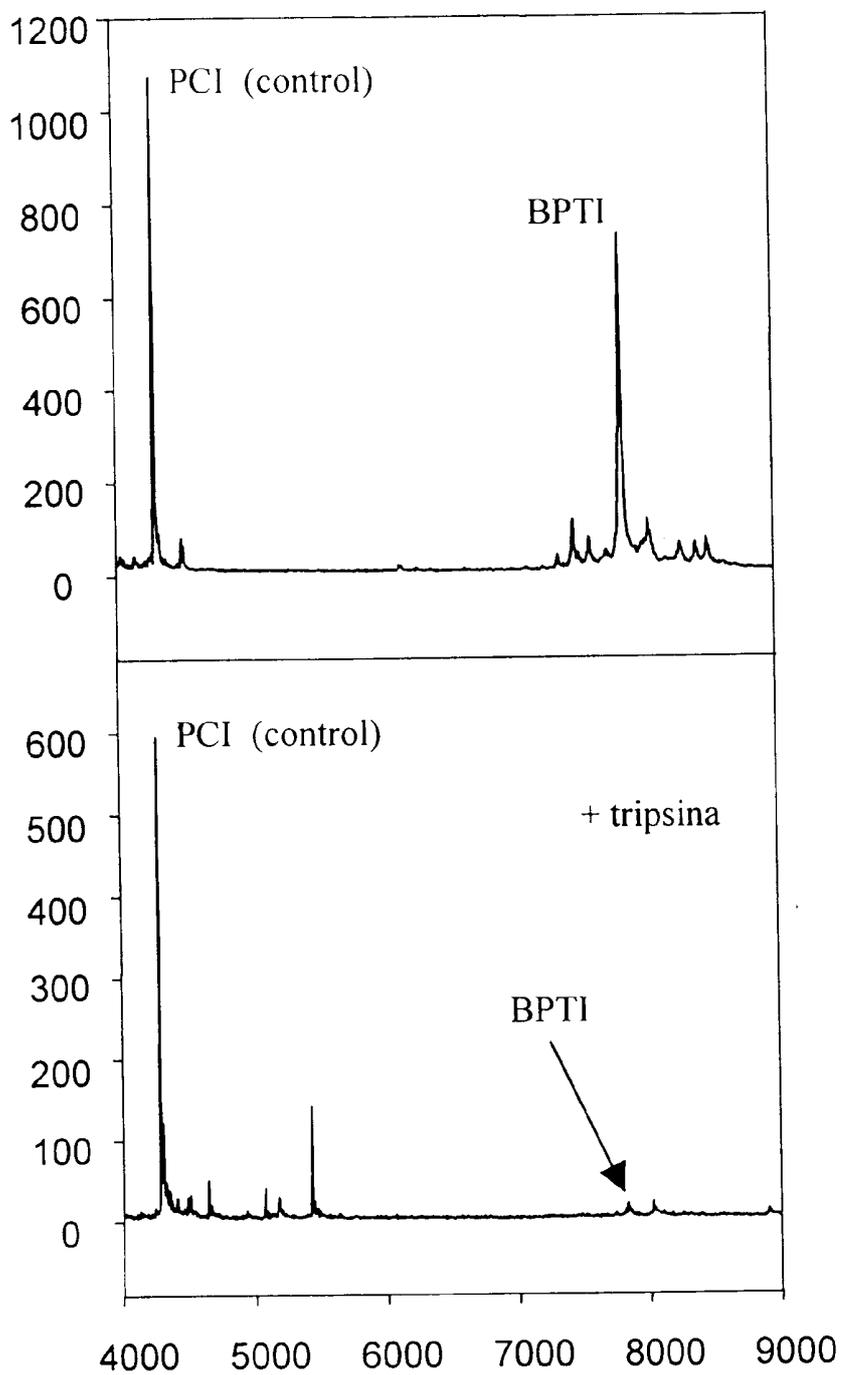


FIG. 1A

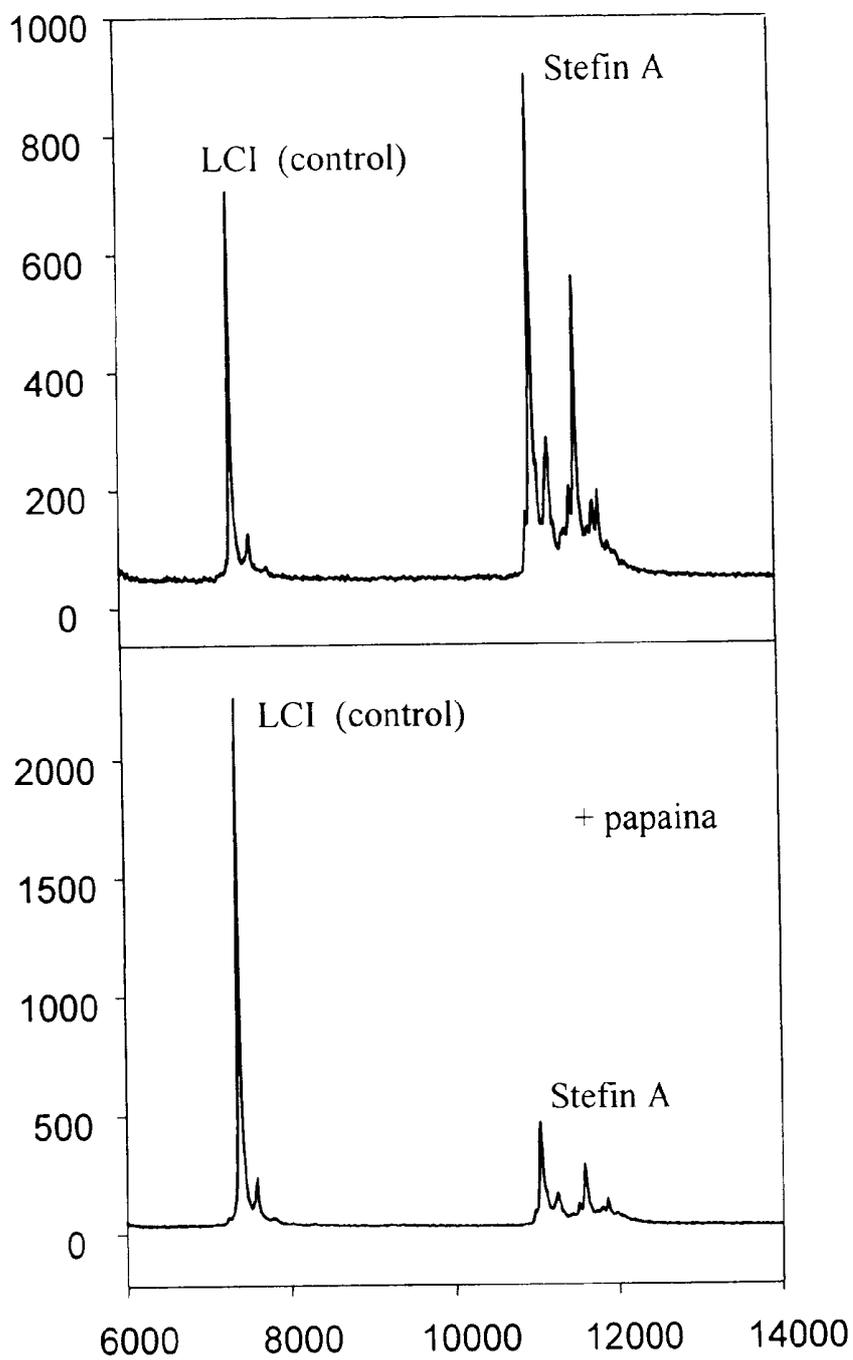


FIG. 1B

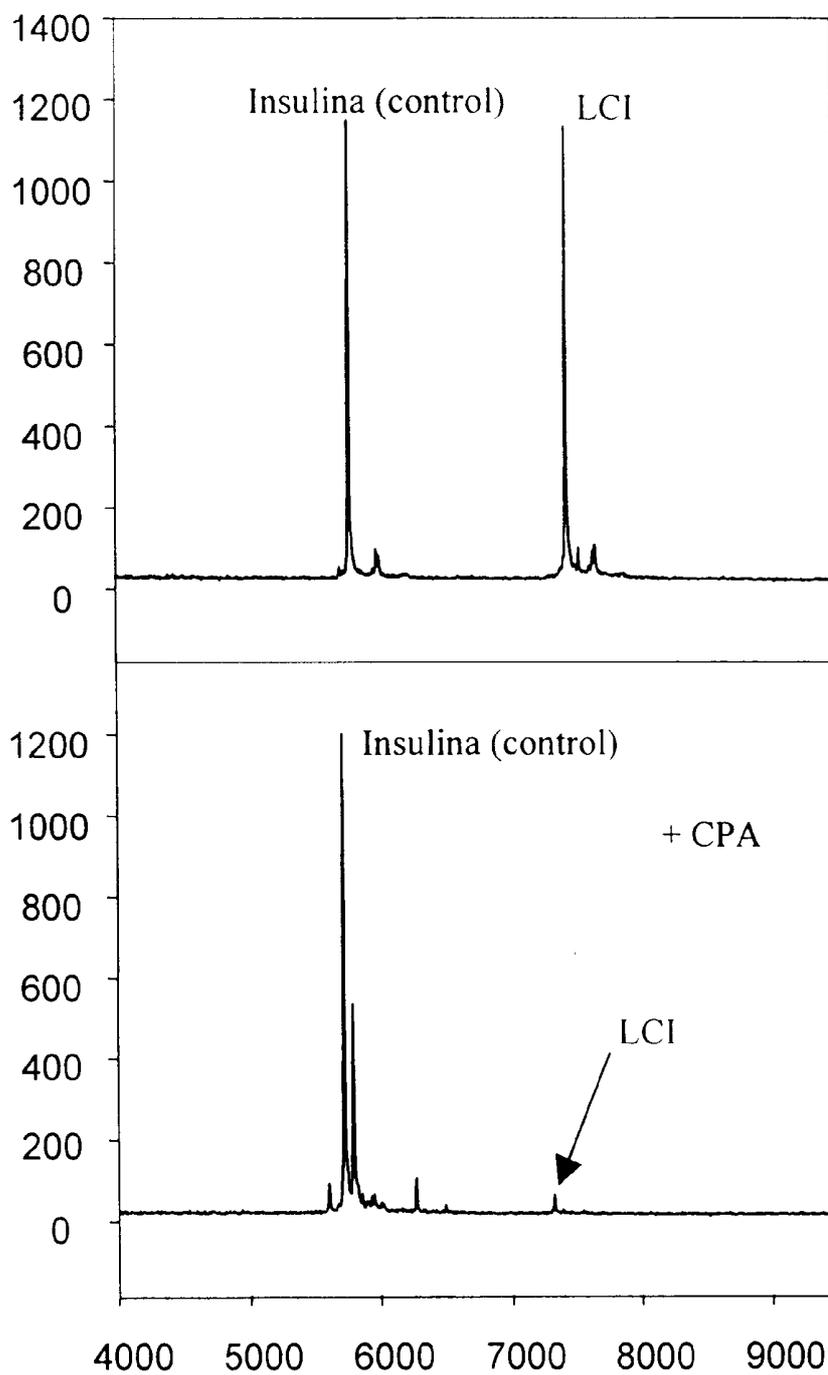
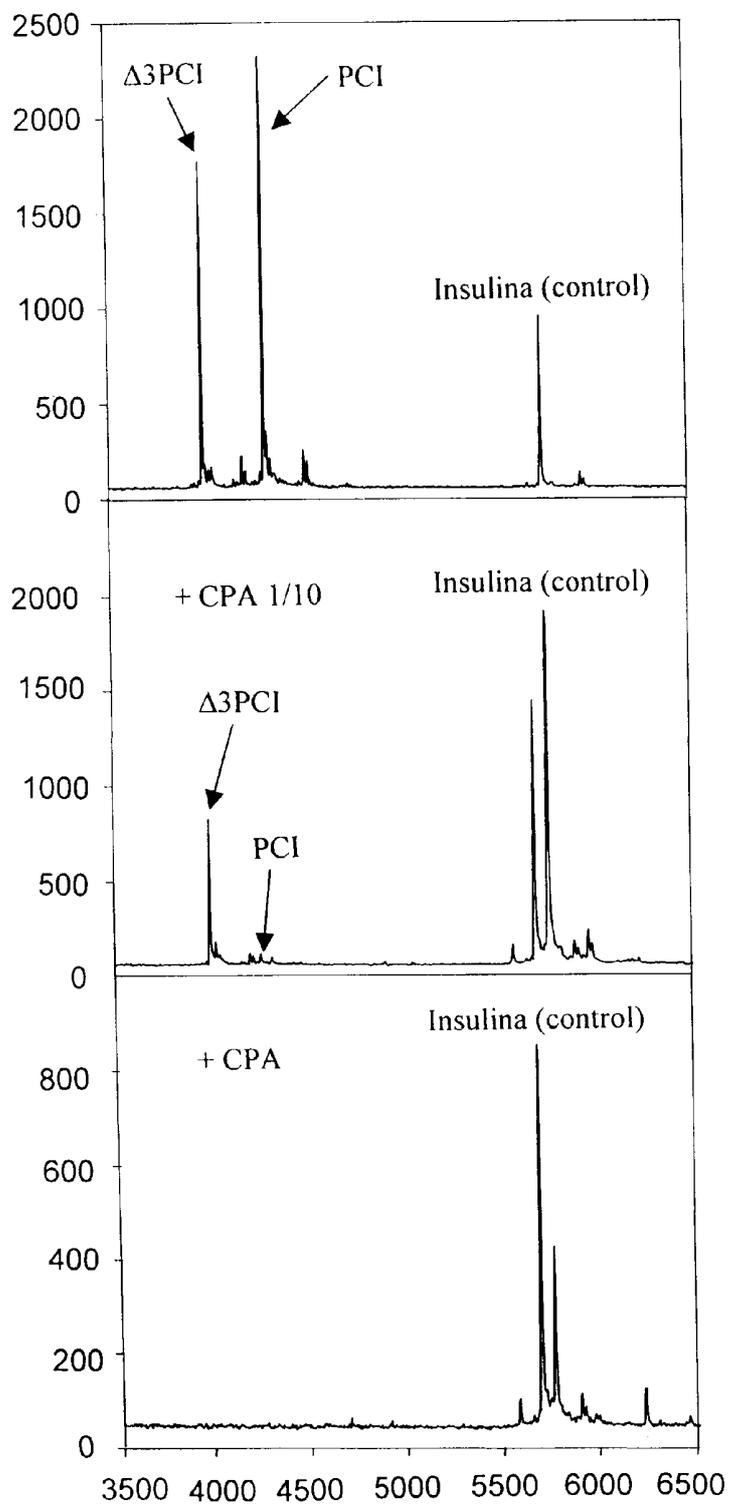


FIG. 1C

FIG. 2



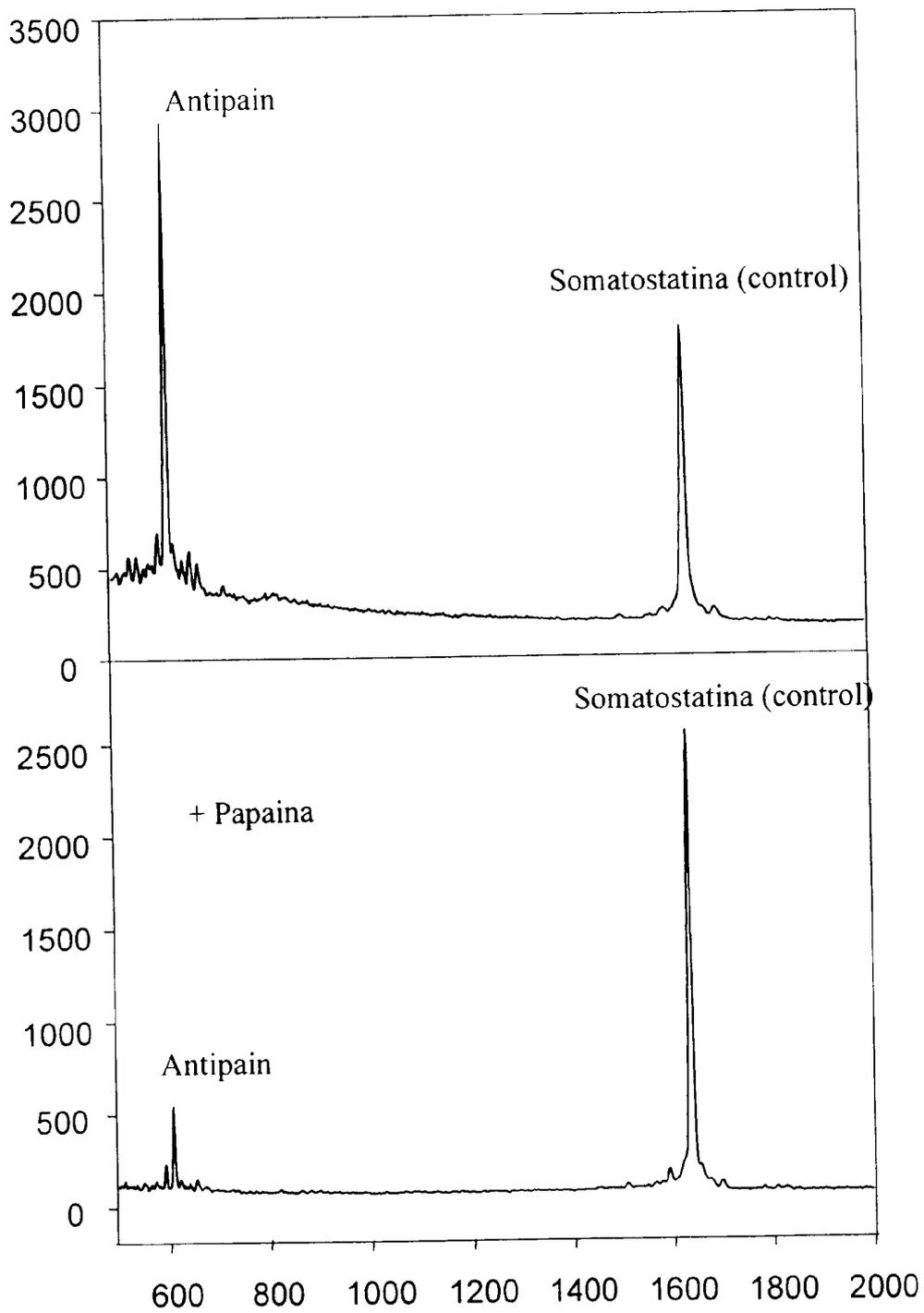


FIG. 3A

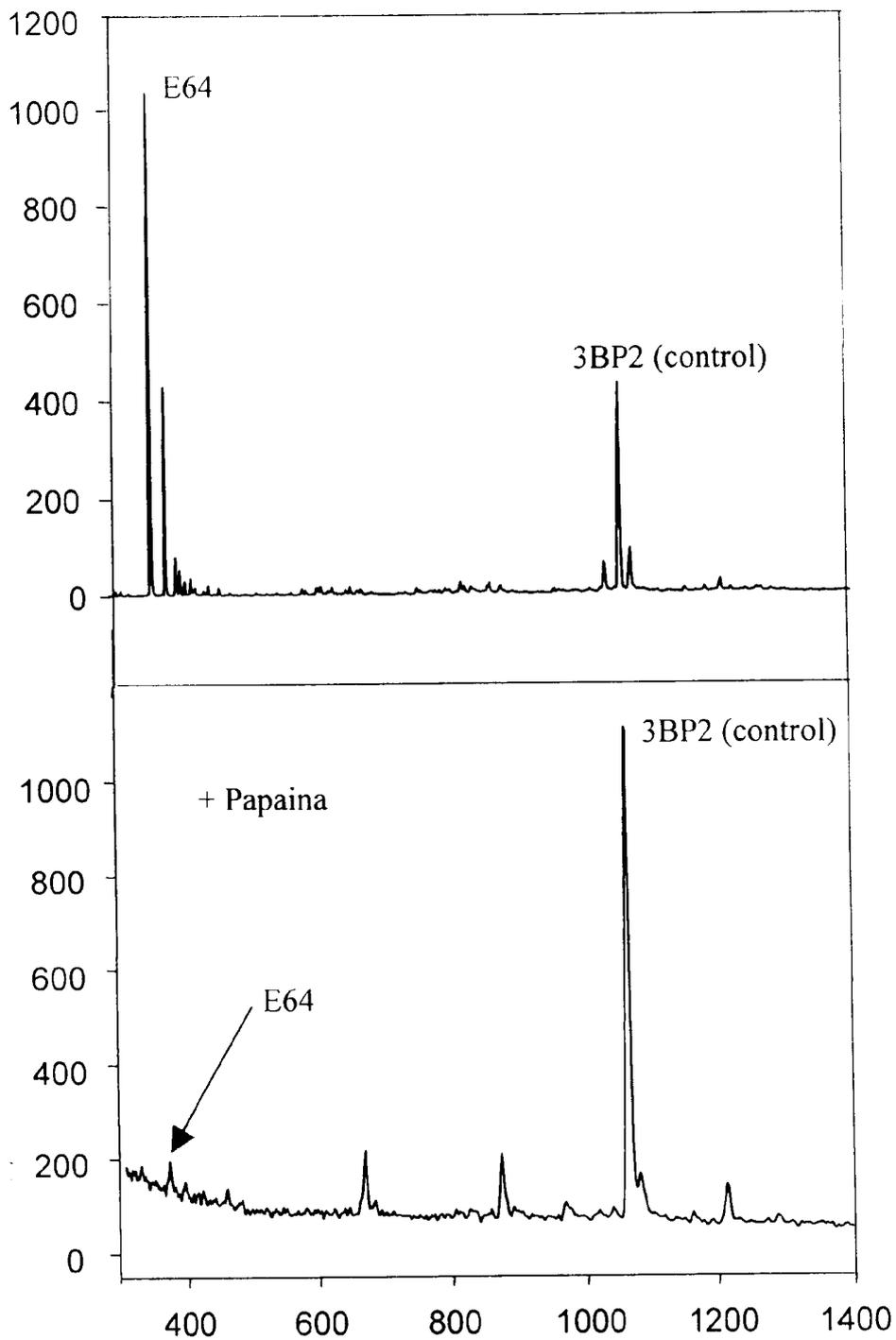


FIG. 3B

FIG. 4

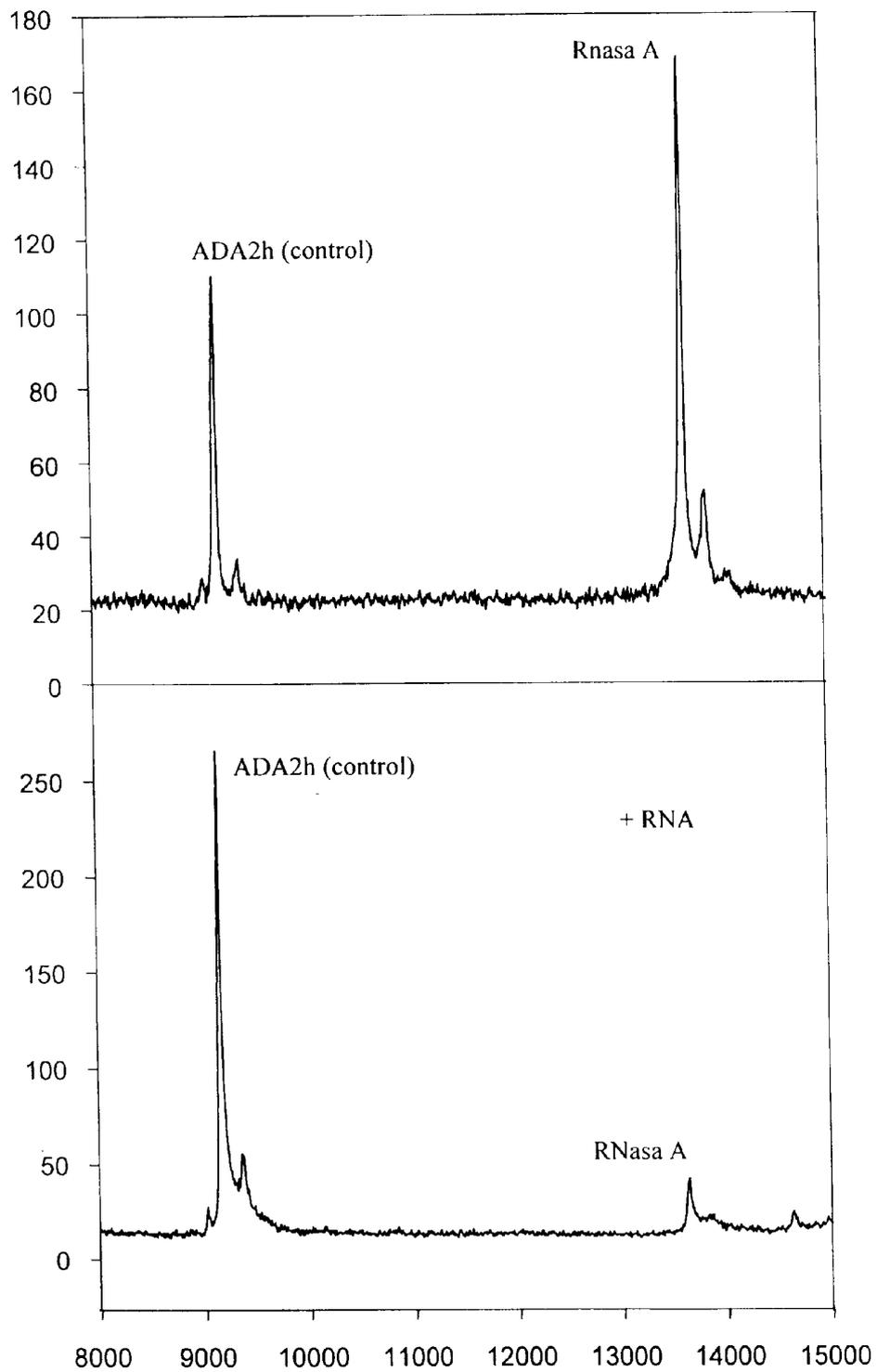


FIG. 5

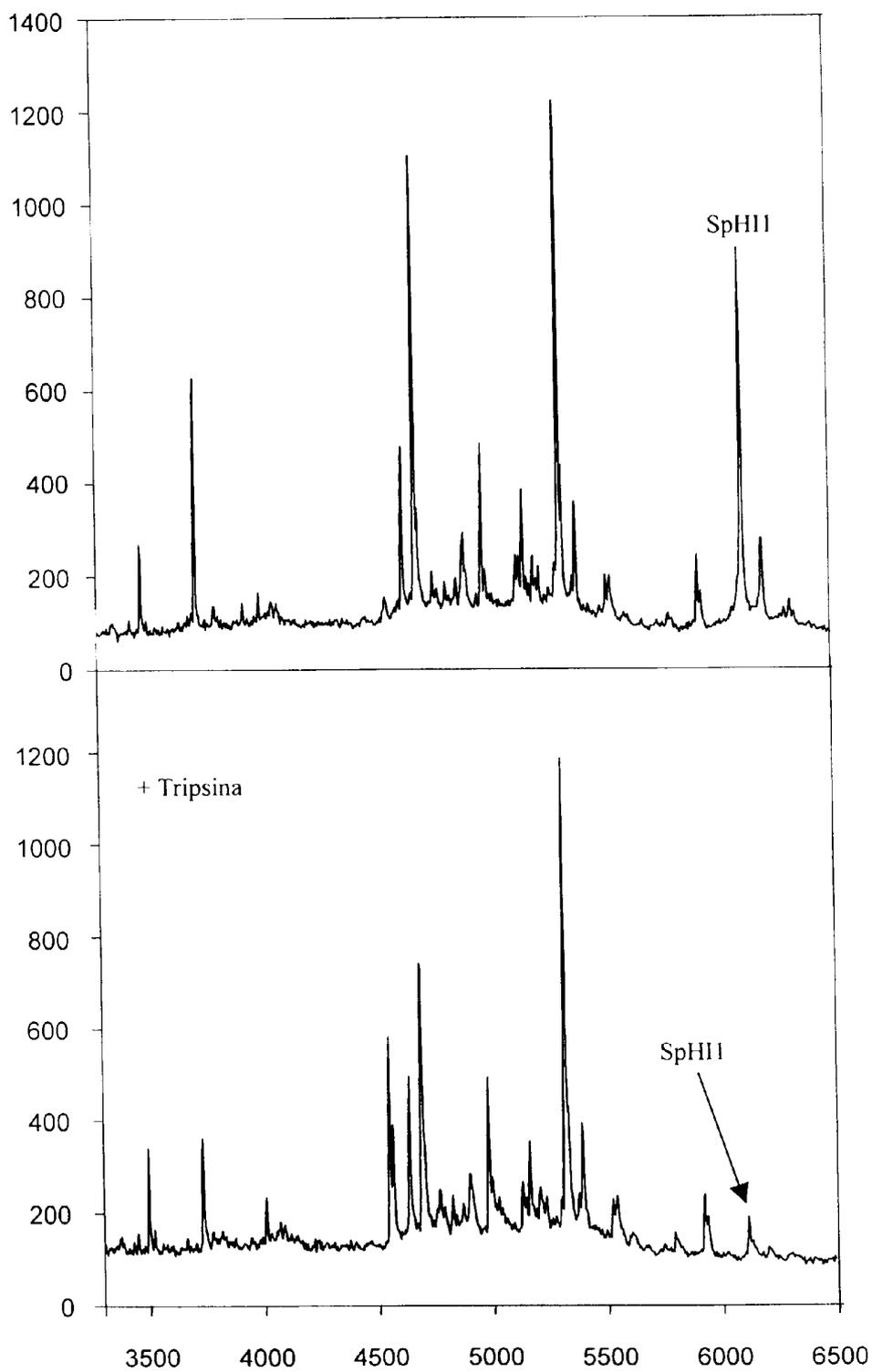


FIG. 6

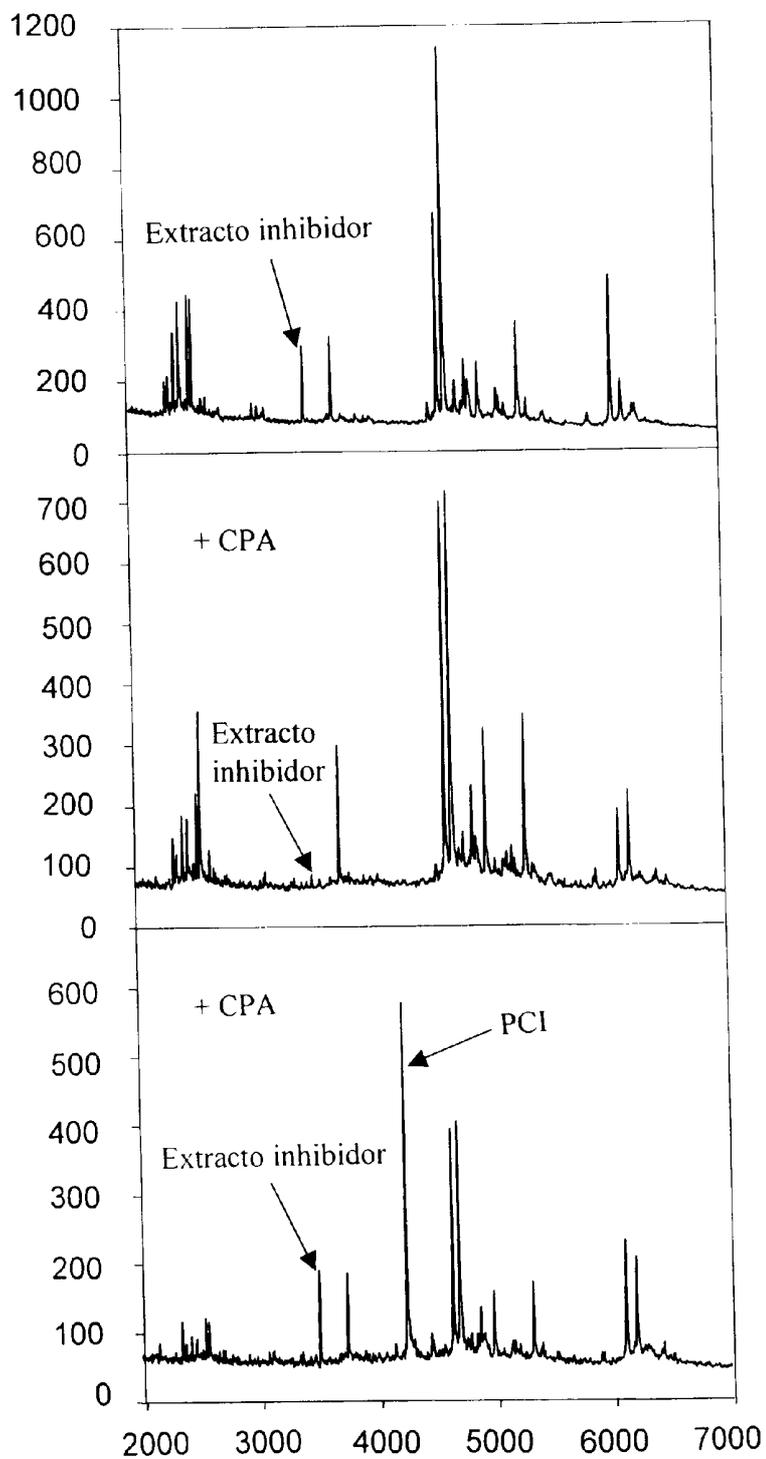
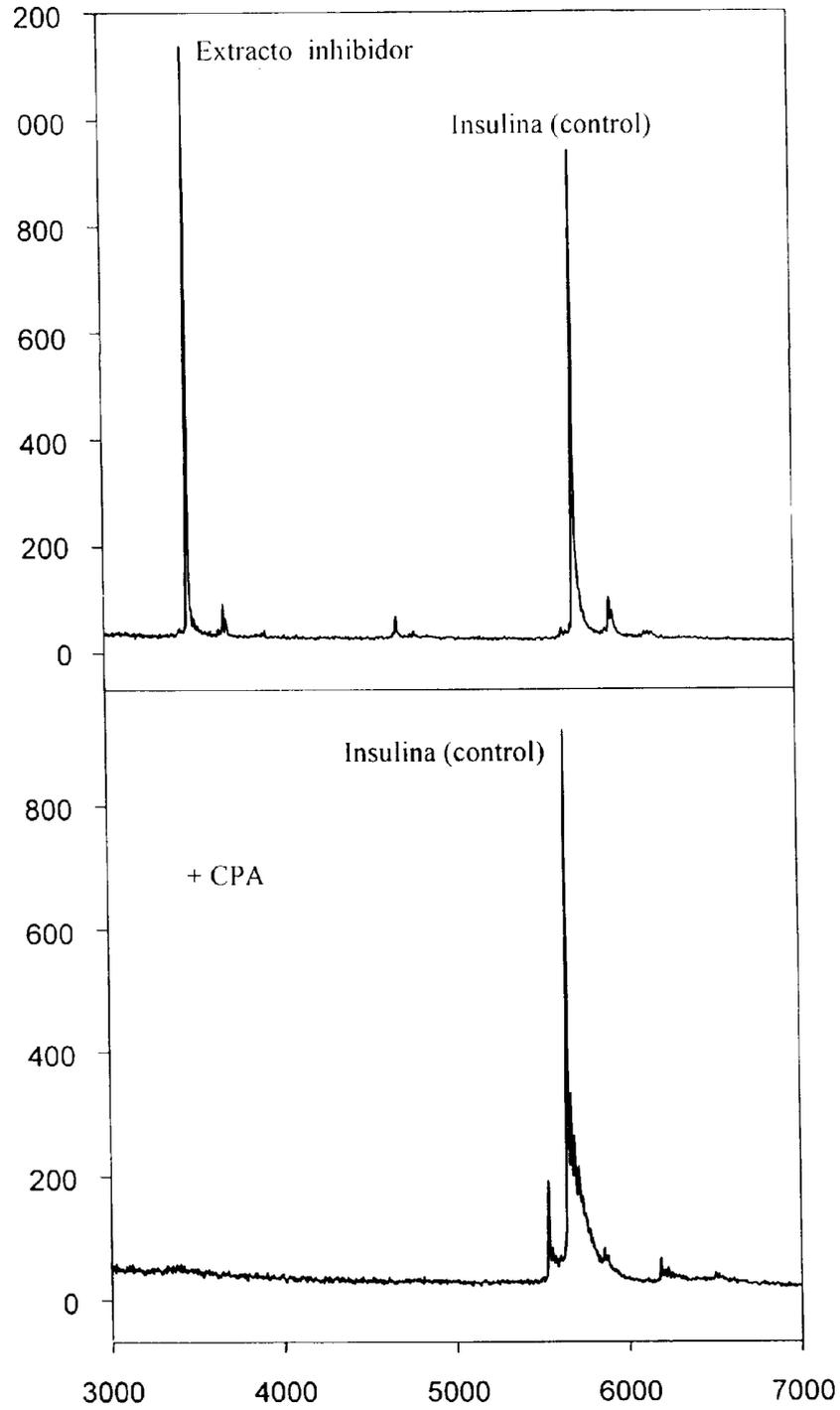


FIG. 7





INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl. 7: G01N 33/68, 33/50

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CANCILLA, M.T.; LEAVELL, M.D.; CHOW, J.; LEARY, J.A. Mass spectrometry and immobilized enzymes for the screening of inhibitor libraries. PNAS. Octubre 2000, Vol. 97, N° 22, páginas 12008-12013.	1-9
A	GRUIC-SOVULJ, I.; LÜDEMANN, H-C.; HILLENKAMP, F. et al. Detection of Noncovalent tRNA.Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. The Journal of Biological Chemistry. Diciembre 1997, Vol. 272, N° 51, páginas 32084-32091.	1,3-6,8,9
A	LIN, S.; COTTER, R.J.; WOODS, A.S. Detection of non-covalent interaction of single and double stranded DNA with peptides by MALDI-TOF. Proteins: Structure, Function, and Genesis. 1998, suplemento 2, páginas 12-21.	1,3-6,8,9
A	MONIATTE, M.; LESIEUR, C.; VÉCSEY-SEMJÉN, B. et al. Matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry in the subunit stoichiometry study of high-mass non-covalent complexes. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes. 1997, Vol. 169-170, páginas 179-199.	1,3-6,8,9

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

**Fecha de realización del informe**

27.10.2003

**Examinador**

E. Relaño Reyes

**Página**

1/1