

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 503**

51 Int. Cl.:

C07D 491/22 (2006.01)
C07D 491/147 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12Q 1/66 (2006.01)
C40B 40/04 (2006.01)
C40B 40/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2013 PCT/US2013/074765**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093677**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13861977 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2932267**

54 Título: **Reconocimiento de unión a diana celular mediante un agente bioactivo usando transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia intracelular**

30 Prioridad:

12.12.2012 US 201261736429 P
15.03.2013 US 201361794461 P
19.09.2013 US 201361880048 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2021

73 Titular/es:

PROMEGA CORPORATION (100.0%)
2800 Woods Hollow Road
Madison, WI 53711, US

72 Inventor/es:

HITKO, CAROLYN W.;
KIRKLAND, THOMAS;
MACHLEIDT, THOMAS;
OHANA, RACHEL F.;
ROBERS, MATT y
WOOD, KEITH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 803 503 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

Reconocimiento de unión a diana celular mediante un agente bioactivo usando transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia intracelular

5

Campo

La presente invención proporciona composiciones y métodos para la detección y análisis de unión intracelular de un agente bioactivo a una diana celular. En particular, en el presente documento se proporcionan agentes bioactivos fijados a fluoróforos, dianas celulares fusionadas a indicadores bioluminiscentes, o porciones, componentes o subunidades de indicadores bioluminiscentes y métodos para detectar y analizar la interacción de agentes bioactivos con dianas celulares con los mismos.

10

Antecedentes

15

La interacción de las especies moleculares con las dianas celulares es de vital importancia para comprender la fisiología celular y desarrollar intervenciones terapéuticas, tales como nuevos fármacos sintéticos y productos biofarmacéuticos. Se necesitan métodos para determinar con precisión y eficiencia la participación de la diana, particularmente dentro de las células vivas donde estas interacciones median en sus respuestas fenotípicas. La capacidad de interrogar afectivamente el compromiso de la diana tiene amplias implicaciones para el proceso de descubrimiento, que van desde la detección de alto rendimiento, optimización de la detección de objetivos en los fármacos principales y el descubrimiento y caracterización de dianas celulares terapéuticamente relevantes.

20

25

La detección basada en fenotipos con una biblioteca de moléculas pequeñas desempeña un papel importante en el campo del descubrimiento de fármacos. Usando tales enfoques de detección, se realiza el cribado de bibliotecas compuestas, sin conocimiento previo de sus dianas celulares subyacentes según su capacidad para provocar una respuesta fenotípica, por ejemplo, mitigar los síntomas de la enfermedad. Si bien este enfoque se puede utilizar para identificar agentes bioactivos, por ejemplo, moléculas pequeñas, que son capaces de modular la fisiología celular, determinar las dianas biológicas relevantes de estas pequeñas coincidencias de moléculas es un desafío técnico importante. Además, las moléculas pequeñas que promueven algunas respuestas fenotípicas deseables pueden presentar responsabilidades *in vivo* debido a interacciones fuera de la diana. Para predecir la selectividad del fármaco y minimizar los posibles efectos secundarios, es importante identificar también las interacciones fuera de la diana (por ejemplo, menor afinidad). La mayoría de los métodos utilizados hoy en día para identificar las dianas de los agentes bioactivos se basan en el enriquecimiento de estas dianas a partir de lisado celular complejo utilizando compuestos "bi-funcionalizados" que contienen un resto selectivo (por ejemplo, el agente bioactivo o compuesto relacionado) y un resto de clasificación (por ejemplo, marcador de afinidad o soporte sólido). Como el enriquecimiento se basa en las propiedades de unión de los compuestos, cuando la afinidad inherente de estos compuestos por su diana es insuficiente, los análogos compuestos están diseñados para unirse covalentemente a la diana (por ejemplo, fotoreticulación). Mediante cualquier enfoque, la eficacia y especificidad del aislamiento de la diana es esencial y la tasa de fallo de estos métodos es alta. El fallo de estos enfoques puede deberse a una captura insuficiente de la diana o un fondo elevado debido a una captura no específica. Los factores que contribuyen a estos fallos incluyen: compuestos que se unen a múltiples dianas con afinidad de baja a moderada con estas interacciones relativamente débiles difíciles de detectar; tecnologías no sesgadas, sencillas y con falta de robustez para caracterizar las interacciones detectadas; incapacidad para realizar el aislamiento de la diana dentro del entorno celular nativo del cual pueden depender las interacciones; información limitada proporcionada sobre la potencia de unión de las dianas en la célula; y alto fondo de interacciones falsas positivas debido a la unión no específica al soporte sólido o molécula pequeña funcionalizada.

30

35

40

45

50

El documento WO 2004/034054 A2 desvela un ensayo BRET mejorado, en el que la señal BRET se potencia y/o prolonga. El ensayo BRET mejorado comprende las etapas de i) añadir un sustrato a una célula que comprende proteína de fusión GPCR-Rluc y una proteína de fusión beta-arrestina-GFP, en el que la (beta-arrestina está mutada, ii) añadir un ligando para obtener, si es posible, un GPCR-Rluc/(complejo beta-arrestina-GFP y iii) medir una señal BRET para obtener una relación BRET, en el que la mejora conduce a un aumento de la relación BRET en comparación con las proporciones obtenidas mediante el uso del mismo proceso que emplea una proteína de fusión beta-arrestina-GFP en la que la beta-arrestina es la beta-arrestina de tipo salvaje o que emplea una proteína de fusión 13-arrestina-GFP, en el que la (beta-arrestina es una beta-arrestina mutada específicamente para que actúe sobre el receptor independientemente del estado de fosforilación de los receptores. La divulgación se refiere además a una solución de sustrato estable para su uso en un ensayo BRET mejorado.

55

60

65

El documento WO 2006/086883 A1 se refiere a biosensores novedosos que se basan en la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET). Estos biosensores pueden usarse para monitorizar la interacción rápida y los cambios conformacionales dentro de los complejos del receptor acoplado a la proteína G/proteína G y, de esta forma, reflejan el estado de activación del receptor. Ventajosamente, los biosensores pueden usarse como un ensayo altamente sensible y cuantitativo para la identificación de ligandos (agonistas, antagonistas, agonistas inversos, agonistas parciales, etc.) dirigidos a receptores acoplados a proteínas G (GPCR), así como para el análisis del estado de activación de estos receptores. Además, la multiplexación de diferentes biosensores dentro de los complejos de

receptores/proteína G permite mapear las texturas de los ligandos. Adicionalmente, los biosensores permiten el examen directo en tiempo real de las interacciones entre los receptores y la proteína G en su entorno natural, la célula viva.

- 5 El documento WO 2013/078244 A1 proporciona nuevos colorantes fluorescentes y kits que contienen los mismos, que son útiles para marcar una amplia variedad de biomoléculas, células y microorganismos, y también proporciona varios métodos de uso de los colorantes fluorescentes para investigación y desarrollo, identificación forense, estudios ambientales, diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de enfermedades.
- 10 El documento US 2006/211045 A1 proporciona una biblioteca que comprende una pluralidad de ligandos no peptídicos marcados de fórmula I $(LigJL)_mL(JTTag)_m(JTL(JLJLig)_m)_p$ incluyendo sales de los mismos que comprenden uno o una pluralidad de restos ligandos iguales o diferentes cada uno unido a una o una pluralidad de restos marcadores iguales o diferentes Tag a través de estos enlazadores L iguales o diferentes y sitio de unión o funcionalidad de unión JT y JL iguales o diferentes en los que Lig comprende un ligando de GPCR, un inhibidor de una enzima intracelular o un sustrato o inhibidor de un transportador de fármacos; L es un enlace simple o es cualquier resto de unión seleccionado de un heteroátomo, tal como N, O, S, P, hidrocarbilo C1-600 de cadena lineal o ramificada, saturado o insaturado que opcionalmente contiene un heteroátomo y combinaciones de los mismos, que puede ser monomérico, oligomérico que tiene una repetición oligomérica de 2 a 30 o polimérico que tiene una repetición polimérica en exceso de 30 a 300; Tag es cualquier sustrato de marcado conocido o novedoso; m se selecciona cada uno independientemente de un número entero positivo de 1 a 3; p es 0 a 3 caracterizado porque la unión está en sitios de unión iguales o diferentes en compuestos que comprenden diferentes Lig, JL, L JT y/o -Tag y está en diferentes sitios de enlace en compuestos que comprenden la misma Lig, JL, L JT y/o -Tag; proceso para la preparación de los mismos; proceso para la preparación de un compuesto de biblioteca de fórmula I o un precursor de fórmula IV; método para seleccionar un compuesto de fórmula I de una biblioteca del mismo; compuesto de fórmula I asociado con información relacionada con sus propiedades farmacológicas; un nuevo compuesto de fórmula I o precursor de fórmula IV; usos de los mismos; métodos de unión o inhibición con los mismos; uso de una diana fluorescente con el mismo; un GPCR de superficie celular modificada y células que expresan el mismo; y un kit que comprende un compuesto de fórmula I y una diana del mismo.

30 Sumario

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas. También desvelado en el presente documento, la presente divulgación proporciona sistemas de ensayo BRET que comprenden: (a) un agente bioactivo fijado a un cromóforo (por ejemplo, fluoróforo); (b) una diana celular fusionada a un indicador bioluminiscente; y (c) un sustrato para el indicador bioluminiscente. En algunas realizaciones, el agente bioactivo es una molécula pequeña. En algunos ejemplos, el agente bioactivo es un inhibidor de la función proteica, por ejemplo, un inhibidor enzimático o un inhibidor del receptor. En algunas realizaciones, el cromóforo es un fluoróforo. En algunas realizaciones, el fluoróforo es un análogo de carboxi-rodamina. En algunas realizaciones, el indicador bioluminiscente comprende un polipéptido con al menos un 70 % de identidad de secuencia (por ejemplo, un 75 % de identidad... un 80 % de identidad... un 85 % de identidad... un 90 % de identidad, un 95 % de identidad... un 98 % de identidad... un 99 % de identidad) con SEQ ID NO:1. En algunos ejemplos, (b) es una diana celular fusionada a una porción, o subunidad, o componente de un indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, (b) es una diana celular fusionada a un polipéptido que requiere interacción con otro polipéptido para producir luminiscencia. En algunas realizaciones, (a) y (b) están dentro de una célula. En algunas realizaciones, (b) se expresa intracelularmente como una proteína de fusión con una proteína de interés, por ejemplo, diana celular. En algunos ejemplos, la diana celular está compuesta por más de un componente, subunidad o polipéptido, por ejemplo, la diana celular es un complejo proteico. En algunos ejemplos, el indicador bioluminiscente está compuesto por más de un componente, subunidad o polipéptido, por ejemplo, el indicador bioluminiscente es un complejo proteico. En algunas realizaciones, (a) se añade extracelularmente y entra en la célula. En algunos ejemplos, (a) está presente tanto dentro de una célula como en el medio que rodea a la célula. En algunos ejemplos, (a) está presente tanto unido a una célula como en el medio que rodea a la célula. En algunas realizaciones, la cantidad de (a) presente en el medio circundante es significativamente mayor que la cantidad en la célula o unida a la célula, por ejemplo, mayor por al menos 2 veces, al menos 5 veces, 10 veces, 30 veces o 100 veces. En algunos ejemplos, la diana celular es una pareja de unión del agente bioactivo. En algunas realizaciones, el espectro de emisión del indicador bioluminiscente se superpone con el espectro de absorción de un fluoróforo. En algunas realizaciones, tras la unión del agente bioactivo a la diana celular, la conversión del sustrato en un producto de reacción por el indicador bioluminiscente da como resultado la excitación de un fluoróforo por BRET y la emisión de luz de un fluoróforo. En algunas realizaciones, (a) es uno de una biblioteca de agentes o compuestos fijados a un cromóforo. En algunas realizaciones, (a) es uno de una biblioteca de agentes o compuestos fijados a fluoróforos. En algunas realizaciones, (b) es uno de una pluralidad de dianas celulares potenciales fusionadas a un indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, (b) es una biblioteca de células que expresa uno de una pluralidad de dianas celulares potenciales fusionadas a un indicador bioluminiscente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de detección, analizar, caracterizar, etc. la unión de un agente bioactivo a una diana celular. En algunos ejemplos, la diana celular puede ser la diana farmacológica primaria. En algunos ejemplos, la diana celular es una responsabilidad inespecífica que puede causar efectos secundarios indeseables *in vivo*. En algunos ejemplos, la unión del agente bioactivo a la diana celular puede no tener

un efecto biológico discernible. En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona células que comprenden uno o más de (por ejemplo, cada uno de) (a) un agente bioactivo fijado a un cromóforo (por ejemplo, fluoróforo); (b) una diana celular fusionada a un indicador bioluminiscente; y (c) un sustrato para el indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, la unión de un agente bioactivo a una diana celular no es covalente. En algunos ejemplos, el cromóforo es un fluoróforo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la detección de una interacción entre un agente bioactivo y una diana celular que comprende: (a) expresar en una célula una fusión de dicha diana celular y un indicador bioluminiscente que emite energía a una primera longitud de onda (por ejemplo, intervalo de longitudes de onda, distribución espectral, etc.); (b) poner en contacto dicha célula con dicho agente bioactivo fijado a un fluoróforo, en el que dicho fluoróforo acepta energía en dicha primera longitud de onda y emite energía en una segunda longitud de onda (por ejemplo, intervalo de longitudes de onda, distribución espectral, etc.); (c) poner en contacto dicha célula con un sustrato para dicho indicador bioluminiscente; (d) detectar energía a dicha segunda longitud de onda, en el que la presencia de dicha energía en dicha segunda longitud de onda indica la interacción de dicho agente bioactivo con dicho objetivo celular. La presente divulgación también proporciona métodos para la detección de una interacción entre un agente bioactivo y una diana celular que comprende: (a) proporcionar una fusión de dicha diana celular y un indicador bioluminiscente; (b) poner en contacto dicha fusión con dicho agente bioactivo fijado a un cromóforo (por ejemplo, fluoróforo); (c) poner en contacto dicha fusión con un sustrato para dicho indicador; (d) detectar un cambio en la distribución espectral de la luz emitida en relación con dicha fusión en contacto con dicho sustrato en ausencia de dicho cromóforo. En algunos ejemplos, la presente divulgación proporciona un método para la detección de una interacción de un segundo agente bioactivo y una diana celular que comprende: (a) proporcionar una fusión de dicha diana celular y un indicador bioluminiscente; (b) poner en contacto dicha fusión con un primer agente bioactivo fijado a un cromóforo (por ejemplo, fluoróforo) y con dicho segundo agente bioactivo; (c) poner en contacto dicha fusión con un sustrato para dicho indicador; (d) detectar un cambio en la distribución espectral de la luz emitida en relación con dicha fusión en contacto con dicho primer agente bioactivo y dicho sustrato en ausencia de dicho segundo agente bioactivo. En algunos ejemplos, el cambio en la distribución espectral de la luz emitida es causado por el desplazamiento de dicho primer agente bioactivo por dicho segundo agente bioactivo. En algunos ejemplos, dicho desplazamiento es un desplazamiento competitivo. En algunos ejemplos, el cambio en la distribución espectral de la luz emitida se utiliza para estimar la afinidad de unión del agente bioactivo a la diana celular. En algunos ejemplos, dicho segundo agente bioactivo es uno de una pluralidad de agentes bioactivos. En algunos ejemplos, el cambio en la distribución espectral de la luz emitida se utiliza para estimar la afinidad de unión relativa de una pluralidad de agentes bioactivos a una diana celular. En algunos ejemplos, dicho primero y dicho segundo agentes bioactivos son moléculas sintéticas. En algunos ejemplos, dichas dianas celulares están en células vivas, células permeabilizadas o lisados celulares. En algunos ejemplos, el cambio en la distribución espectral de la luz emitida se determina midiendo la relación de la intensidad de la luz en dos longitudes de onda diferentes o dos intervalos diferentes de longitudes de onda. En algunos ejemplos, se detecta el cambio en la distribución espectral a lo largo del tiempo. En algunos ejemplos, el cromóforo es un fluoróforo.

También se desvela en el presente documento un sistema de ensayo BRET que comprende: (a) un agente bioactivo fijado a un fluoróforo; (b) un primer compañero de interacción fusionado con un péptido estructuralmente complementario de un indicador bioluminiscente; (c) un segundo compañero de interacción fusionado con un polipéptido estructuralmente complementario de un indicador bioluminiscente; y (d) un sustrato para el indicador bioluminiscente, en el que el primer y el segundo compañero de interacción interactúan para formar un complejo de interacción, y en el que el primer compañero de interacción, el segundo compañero de interacción y/o el complejo de interacción son compañeros de unión para el agente bioactivo. En algunos ejemplos, el primer compañero de interacción y el segundo compañero de interacción son proteínas o polipéptidos que interactúan para formar un complejo proteico. En algunos ejemplos, el primer compañero de interacción y el segundo compañero de interacción se unen por la interacción de los polipéptidos estructuralmente complementarios. En algunos ejemplos, los polipéptidos estructuralmente complementarios se unen por la interacción del primer compañero de interacción y el segundo compañero de interacción. En algunos ejemplos, la interacción del primer compañero de interacción y el segundo compañero de interacción está determinada por un aumento de la luminiscencia. En algunos ejemplos, el primer y el segundo compañero de interacción forman el complejo de interacción en presencia o ausencia del agente bioactivo. En algunos ejemplos, el complejo de interacción es un compañero de unión para el agente bioactivo, pero ni el primero o el segundo compañero de interacción son compañeros de unión para el agente bioactivo. En algunos ejemplos, uno de los compañeros de interacción, pero no el otro, es un compañero de unión para el agente bioactivo. En algunos ejemplos, la formación del complejo de interacción requiere la unión del agente bioactivo a un compañero de interacción. En algunos ejemplos, la formación del complejo de interacción es independiente de la unión del agente bioactivo. También se desvelan en el presente documento sistemas de ensayo BRET que comprenden: (a) un agente bioactivo fijado a un fluoróforo; (b) una diana celular fusionada con un péptido estructuralmente complementario de un indicador bioluminiscente; (c) un polipéptido estructuralmente complementario de un indicador bioluminiscente; y (d) un sustrato para el indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, el péptido y polipéptido complementarios del indicador bioluminiscente se asocian para formar una enzima indicadora bioluminiscente activa. En algunos ejemplos, tras la unión del agente bioactivo a la diana celular y la asociación del péptido y polipéptido complementarios, la conversión del sustrato en un producto de reacción por la enzima indicadora bioluminiscente da como resultado la excitación del fluoróforo por BRET y la emisión de fluorescencia del fluoróforo.

También se desvela en el presente documento un sistema de ensayo que comprende: (a) un agente bioactivo fijado a un fluoróforo; (b) un primer compañero de unión fusionado a un péptido complementario de un indicador

bioluminiscente; (c) un segundo compañero de unión fusionado a un polipéptido complementario de un indicador bioluminiscente; y (c) un sustrato para el indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, el péptido y polipéptido complementarios del indicador bioluminiscente se asocian para formar una enzima indicadora bioluminiscente activa. En algunos ejemplos, cuando el primer y segundo compañeros de unión interactúan, el agente bioactivo se une a los compañeros que interactúan y se produce la asociación del péptido y polipéptido complementario, la conversión del sustrato en un producto de reacción por la enzima indicadora bioluminiscente da como resultado la excitación del fluoróforo por BRET y la emisión de fluorescencia del fluoróforo.

En algunos ejemplos, el agente bioactivo está fijado a un inactivador de la fluorescencia o luminiscencia (por ejemplo, Dabcyl). En tales ejemplos, la titulación del agente bioactivo no fijado produce una ganancia en la señal.

También se desvela en el presente documento la obtención de imágenes (por ejemplo, imagen BRET, a través de la cámara con dispositivo de acoplamiento de carga, etc.) de cualquiera de los sistemas descritos en el presente documento para confirmar y/o identificar la ubicación (por ejemplo, intracelular, extracelular, etc.) de señales de fluorescencia y/o BRET resultantes de la presencia y/o interacciones de los componentes del sistema (por ejemplo, agente bioactivo, diana celular, etc.).

En algunos ejemplos, los sistemas y métodos descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, el ejemplo 23 para una realización de ejemplo) son útiles para la medición de la selectividad intracelular y la afinidad de un agente bioactivo contra un panel de supuestas dianas celulares. En algunos ejemplos, el efecto sobre BRET se controla a medida que el complejo agente bioactivo/diana celular se interrumpe competitivamente. En algunos ejemplos, las afinidades se infieren por el valor de CI_{50} generado a través de la interrupción competitiva. En algunos ejemplos, las afinidades de los inhibidores a los dominios individuales de una diana celular se determinan mediante la fusión genética de un indicador bioluminiscente a un dominio segregado de la diana celular.

Dibujos

La figura 1 muestra una representación esquemática de una realización de la presente invención: (A) agente bioactivo fijado a fluoróforo y diana celular fijado a indicador bioluminiscente; (B) unión del agente bioactivo a la diana celular; (C) la adición de sustrato indicador da como resultado BRET; y (D) el desplazamiento por exceso de agente bioactivo no fijado da como resultado la pérdida de BRET y fluorescencia.

La Figura 2 muestra gráficos que comparan los perfiles de BRET de dos derivados diferentes de fluoróforo-SAHA como aceptores de BRET para fusiones de NANOLUC-HDAC6 en células vivas.

La Figura 3 muestra gráficos que representan el efecto de la dilución de la expresión en el rendimiento del ensayo. El primer gráfico demuestra el efecto de la expresión disminuida en la ventana del ensayo BRET utilizando el desplazamiento competitivo de SAHA FIJADO AL fluoróforo de HDAC6 fusionado a NANOLUC. El segundo gráfico muestra el efecto de la expresión disminuida en ambas ventanas de ensayo BRET, así como la potencia observada del compuesto (CE_{50}) para la unión del trazador del fármaco al receptor de NanoLuc-Histamina H1.

La figura 4 muestra gráficos que demuestran el requisito del medio celular para el procesamiento del profármaco.

La figura 5 muestra gráficos que demuestran la capacidad de usar agentes de permeabilización para potenciar la entrada de trazadores de fármacos impermeables.

La figura 6 muestra un gráfico que representa el desplazamiento competitivo del derivado de BIRB fijado al fluoróforo de p38 fusionado con NANOLUC.

La figura 7 muestra gráficos que representan la medición de la cinética del derivado de BIRB fijado al fluoróforo de p38 fusionado con NANOLUC.

La figura 8 muestra ejemplos de agentes bioactivos fijados a fluoróforos de ejemplo y otros compuestos que encuentran uso en las realizaciones descritas en el presente documento.

La figura 9 muestra una comparación de fusiones de p38 con luciferasa de Renilla y luciferasa NanoLuc dentro de una realización descrita en el presente documento.

La figura 10 muestra que la interacción de alta afinidad con un trazador de fármaco con señal óptima de fondo se logra cuando la expresión de la fusión NANOLUC está cerca del nivel endógeno.

La figura 11 muestra curvas de dosis-respuesta para la unión de NanoLuc-p38alfa a un conjugado BIRB-TOM en comparación con un conjugado BIRB-TMR.

La figura 12 muestra curvas de dosis-respuesta para la unión de PKCalfa-NanoLuc a un conjugado BIM-TOM en comparación con un conjugado BIM-TMR.

- La figura 13 muestra un gráfico que representa la detección de respuesta BRET específica en células vivas.
- 5 La figura 14 muestra la afinidad de PBI-4838 por Jnk2, p38beta y p38alfa.
- La figura 15 muestra la afinidad de PBI-4838 por Jnk2, p38beta y p38alfa.
- La Figura 16 muestra las afinidades relativas de PBI-4966 por BRD4 de tipo salvaje frente al BRD4 mutante.
- 10 La figura 17 muestra que los compuestos estructuralmente distintos se pueden identificar por desplazamiento competitivo de trazadores de fármacos usando el método de la presente invención.
- La figura 18 muestra la capacidad de controlar las interacciones fármaco/diana utilizando el conjugado de fármaco-fluoróforo en las células.
- 15 La figura 19 muestra gráficos que representan una respuesta BRET específica en TNT.
- La figura 20 muestra gráficos que representan la medición de la unión de citocinas marcadas con fluorescencia a NanoLuc-EGFR. Las afinidades de los anticuerpos terapéuticos, Vectibix, Erbitux y Herceptin, también se demuestran por el desplazamiento competitivo de la citocina.
- 20 La figura 21 contiene barridos de longitud de onda para un polipéptido complementario (SEQ ID NO:5) complementados con un péptido complementario solo (SEQ ID NO: 4) o el péptido complementario (SEQ ID NO: 4) conjugado con TMR, lo que demuestra una transferencia de energía eficiente.
- 25 La figura 22 contiene barridos de longitud de onda para NanoLuc fusionado a Hao Tag (NL-HT) y un polipéptido complementario (SEQ ID NO: 6) complementado con un péptido complementario unido a un pigmento TOM sin cloro fluorescente (NCT) (PBI-5074).
- 30 La figura 23 muestra un esquema de una interacción terciaria en la que la transferencia de energía con un complejo de un péptido y polipéptido estructuralmente complementario de una proteína bioluminiscente también puede usarse para medir la interacción de los compañeros de interacción. En el esquema, un GPCR (primer compañero de interacción) fusionado con un polipéptido complementario de una proteína bioluminiscente y una proteína de interacción con el GPCR (segundo compañero de interacción) fusionado con un péptido complementario de una proteína bioluminiscente forman un complejo bioluminiscente cuando interaccionan (para formar un complejo de interacción). Esto permite la medición de la interacción binaria. Si un ligando de GPCR de molécula pequeña con un resto fluorescente para la transferencia de energía interacciona con este sistema, se produce transferencia de energía. Por consiguiente, la interacción proteína-proteína binaria y la interacción ternaria fármaco-proteína-proteína se pueden medir en el mismo experimento.
- 35 La figura 24 muestra gráficos que demuestran que los datos de BRET entre una fusión expresada celularmente del péptido 11S y BRD4 y NCT añadido exógenamente conjugado con el ligando BRD4 dependen de la presencia de PEP-80 (el complementario estructural de 11S); (A) intensidad del donante, (B) intensidad del aceptor.
- 40 La figura 25 muestra gráficos que demuestran que los datos de BRET entre una fusión expresada celularmente del péptido 11S y BRD4 y NCT añadido exógenamente conjugado con iBET dependen de la presencia de PEP-80 (el complementario estructural de 11S); (A) PEP-80 1 μ M, (B) sin control de PEP-80.
- 45 La figura 26 muestra señales BRET (intensidades de receptor y donante) que dependen del complejo 11S-BRD4/114-Histona H3.3 facilitado.
- 50 La figura 27 muestra que un ligando fluorescente de BRD4 (iBET-NCT/PBI-4966) puede desplazar el complejo 11S-BRD4/114-Histona H3.3.
- 55 La figura 28 muestra el desplazamiento competitivo iBET-151 IC50 no fluorescente del complejo 11S-BRD4/114-Histona H3.3.
- La figura 29 muestra que los HDAC de Clase I (HDAC1, 2, 3 y 8) generan señales BRET específicas con SAHA-TOM, según lo predicho basado en la afinidad y selectividad indicadas de SAHA a estas dianas individuales.
- 60 La figura 30 muestra que los HDAC de clase IIb (HDAC6 y 10), así como los dominios segregados de HDAC6, generan BRET específico con SAHA-TOM, según lo predicho basado en la afinidad y selectividad indicadas de SAHA a estas dianas individuales.
- 65 La figura 31 muestra que los HDAC de Clase IIa no generan BRET significativo con SAHA-TOM, según lo predicho en función de la selectividad indicada de SAHA por HDAC de Clase I y IIb.

La figura 32 muestra los resultados de desplazamiento competitivo de SAHA contra fusiones individuales HDAC-NanoLuc en complejo con SAHA-TOM, según lo determinado mediante BRET. A partir de estas curvas de respuesta de concentración, los valores de CI-50 se pueden calcular, como se muestra en la tabla al lado del gráfico.

La figura 33 (izquierda) muestra una conversión entre el valor de CI-50 y el valor Ki para las fusiones HDAC-NanoLuc individuales, según lo determinado mediante BRET. Para esta conversión se usó la ecuación de Cheng-Prusoff. La figura 33 (derecha) muestra un diagrama que representa las afinidades relativas de SAHA contra las proteínas de fusión HDAC/NanoLuc individuales, según lo determinado mediante BRET.

La figura 34 muestra imágenes BRET de complejos intracelulares HDAC10-NLuc/PBI-4968 +/- SAHA en presencia o ausencia de SAHA como control de especificidad.

La figura 35 muestra imágenes BRET de complejos intracelulares NLuc-HDAC6/PBI-4968 +/- SAHA en presencia o ausencia de SAHA como control de especificidad.

La figura 36 muestra el análisis de gráfico de puntos de experimentos de formación de imágenes BRET de SAHA-TOM (PBI-4968) intracelulares de unión a SAHA con HDAC10 y HDAC6.

Descripción detallada

La presente invención proporciona composiciones y métodos para la detección y análisis de unión intracelular de un agente bioactivo a una diana celular. En particular, en el presente documento se proporcionan agentes bioactivos fijados a un cromóforo, por ejemplo, fluoróforos, potenciales dianas celulares fusionadas a proteínas indicadoras bioluminiscentes y métodos para detectar y analizar la interacción de agentes bioactivos con dianas celulares con los mismos (véase la Figura 1).

Se detecta la interacción de una primera entidad (por ejemplo, agente bioactivo) y una segunda entidad (por ejemplo, diana celular), caracterizada, cuantifica, analiza, etc. a través de la detección/medición de una señal producida por transferencia de señal (por ejemplo, transferencia de energía (por ejemplo, fluorescencia, energía luminosa, resonancia, por BRET, etc.)) entre una tercera entidad (por ejemplo, fluoróforo) conectada, fusionada, fijada, unida, etc. a la primera entidad y una cuarta entidad (por ejemplo, proteína indicadora bioluminiscente) conectada, fusionada, fijada, unida, etc. a la segunda entidad. La interacción y/o unión de la primera y segunda entidad acercan la tercera y cuarta entidad lo bastante como para permitir la transferencia de señal (por ejemplo, transferencia de energía) de una a otra. En algunos ejemplos, la cuarta entidad (por ejemplo, proteína indicadora bioluminiscente) emite energía (por ejemplo, tras la interacción con su sustrato) y dicha energía emitida es absorbida por la tercera entidad (por ejemplo, fluoróforo), haciendo que la tercera entidad emita energía mensurable diferente desde la cuarta entidad (por ejemplo, luz a una longitud de onda diferente). En tales ejemplos, la detección de la energía emitida por la tercera entidad (por ejemplo, luz en el máximo de emisión de la tercera entidad) tras la adición al sistema del sustrato para la cuarta entidad (por ejemplo, indicador bioluminiscente) indica la interacción de la primera y la segunda entidades. En algunos ejemplos, la duración, la cinética, la afinidad, la fuerza y / o la especificidad, de la unión de la primera y segunda entidades se detecta, mide, cuantifica, determina, cuestiona, etc. según la medición de la salida de señal de la cuarta entidad (por ejemplo, proteína indicadora bioluminiscente) en diversas condiciones.

En diversos ejemplos, una diana celular fusionada a una proteína indicadora bioluminiscente y un agente bioactivo fijado a un cromóforo, por ejemplo, fluoróforo, se proporcionan (por ejemplo, intracelularmente, extracelularmente, en lisado, *in vitro*, etc.). El sustrato para la proteína indicadora bioluminiscente se añade al sistema. Si se ha producido una interacción (por ejemplo, unión) entre el agente bioactivo y la diana celular, la proteína indicadora bioluminiscente y el cromóforo (por ejemplo, fluoróforo) se acercan lo suficientemente cerca como para que ocurra BRET, y se emite una señal detectable desde el cromóforo (por ejemplo, fluoróforo).

En algunos ejemplos, se utilizan un péptido y polipéptido complementarios que pueden interactuar (por ejemplo, formar un complejo) para formar una proteína indicadora bioluminiscente (o complejo de proteínas). En algunos ejemplos, un péptido complementario se fusiona con un primer compañero de interacción y un polipéptido complementario se fusiona con un segundo compañero de interacción. En algunos ejemplos, el primer y el segundo compañero de interacción forman un complejo (por ejemplo, al unirse entre sí). En algunos ejemplos, el primer y el segundo compañero de interacción forman un complejo de interacción cuando uno o ambos interactúan con un agente bioactivo. En algunos ejemplos, el primer y el segundo compañero de interacción forman un complejo de interacción en presencia o ausencia de un agente bioactivo. En algunos ejemplos, la formación del complejo de interacción une el péptido y el polipéptido complementarios para formar el indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, la formación del indicador bioluminiscente permite la detección de la formación del complejo de interacción. En algunos ejemplos, un fluoróforo está fijado al agente bioactivo. En algunos ejemplos, la energía se transfiere desde el indicador bioluminiscente al fluoróforo cuando se forma el complejo de interacción y el agente bioactivo se une a uno de los compañeros de interacción o al complejo de interacción. En algunos ejemplos, el fluoróforo permite la detección o medición de la interacción del primer y segundo compañero de interacción. En algunos ejemplos, el

fluoróforo permite la detección o medición de la unión del agente bioactivo a su compañero de unión (por ejemplo, el primer compañero de interacción, el segundo compañero de interacción y/o el complejo de interacción).

En algunos ejemplos, un péptido complementario de un indicador bioluminiscente se fusiona con una diana de interés. Se proporcionan un polipéptido complementario y un agente bioactivo fijados a un fluoróforo para detectar o medir la interacción del agente bioactivo con la diana de interés. En algunos ejemplos, el péptido complementario de un indicador bioluminiscente se fusiona con una diana de interés, se aplica un polipéptido complementario de la proteína indicadora bioluminiscente y un agente bioactivo fijado a un fluoróforo para detectar la proximidad del ligando marcado con fluorescencia, por ejemplo, un agente bioactivo, a complejos proteicos (por ejemplo, detectar la unión del ligando selectivamente a receptores heterodiméricos u homodiméricos) uniendo miembros del complejo a componentes de un donante luminiscente multicomponente. Por lo tanto, esta aplicación podría usarse para monitorizar la unión de la diana dentro de los complejos de proteínas que pueden tener un papel en la patología de la enfermedad.

En algunos ejemplos, la fusión de la diana celular y el indicador bioluminiscente se expresa en células en las que se va a realizar un ensayo. En algunos ejemplos, la fusión se expresa en o cerca de la abundancia nativa para la diana celular. En algunos ejemplos, el agente bioactivo fijado al fluoróforo se añade extracelularmente (por ejemplo, se añade al medio de cultivo) y entra a la célula por difusión, transporte activo, transporte pasivo, endocitosis o cualquier mecanismo adecuado. En algunos ejemplos, se añade una cantidad variable de agente bioactivo fijado a un fluoróforo a las células para analizar la cinética de unión, analizar la afinidad de unión, proporcionan señal suficiente, etc.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones, métodos y sistemas para la detección de interacciones intracelulares entre un agente bioactivo y una diana celular (por ejemplo, conocido o desconocido). En algunas realizaciones, una fusión de un indicador bioluminiscente y una diana celular se expresan dentro de una célula. El agente bioactivo, fijado a un fluoróforo, se introduce en la célula (por ejemplo, el conjugado de fluoróforo y agente bioactivo es permeable a las células, la célula se permeabiliza, etc.). Un sustrato para la proteína indicadora bioluminiscente se añade a la célula antes, de forma concurrente o después de la adición del agente bioactivo. La detección de una señal fluorescente del fluoróforo (como resultado de BRET) indica una interacción intracelular (por ejemplo, unión) entre el agente bioactivo y la diana celular. En algunos ejemplos, una diana celular fusionada a un indicador bioluminiscente se expresa en una abundancia celular natural (por ejemplo, en relación con la diana celular nativa, o a un nivel apropiado para la función biológica adecuada de la diana fusionada). En algunos ejemplos, la interacción de un agente bioactivo con una diana celular se detecta intracelularmente.

En algunos ejemplos, las características de la interacción entre el agente bioactivo y la diana celular se interrogan alterando las condiciones celulares o las condiciones del sistema. Por ejemplo, se añade a la célula un enlazador competitivo de la diana celular (por ejemplo, agente bioactivo no unido) para competir con el agente bioactivo fijado a un fluoróforo.

En algunos ejemplos, se proporciona una biblioteca de dianas celulares marcadas con proteínas indicadoras bioluminiscentes (por ejemplo, en solución, en un lisado, inmovilizadas sobre una superficie, expresadas dentro de una célula, etc.). En algunos ejemplos, se proporciona un agente bioactivo que carece de una diana celular conocida o donde el conocimiento de la diana celular es incierto o incompleto. La diana celular de un agente bioactivo se determina mediante la adición del agente bioactivo a la biblioteca y determinando qué fusión celular-diana produce fluorescencia inducida por BRET del fluoróforo fijado al agente bioactivo. En algunos ejemplos, la biblioteca de dianas celulares marcadas con indicador bioluminiscente se proporciona como una colección de ácidos nucleicos o vectores que comprenden ácidos nucleicos (por ejemplo, plásmidos, virus BacMam, Lentivirus, etc.) que codifican las fusiones proteicas. En algunas realizaciones, las dianas celulares marcadas con proteínas indicadoras bioluminiscentes se expresan dentro de las células. En algunos ejemplos, la biblioteca de dianas celulares marcadas con indicadores bioluminiscentes se proporciona traduciendo ácidos nucleicos en reacciones de traducción sin células. En algunos ejemplos, una biblioteca de fusiones de dianas celulares o células que expresan fusiones de dianas celulares, se proporcionan en un formato de microplaca. En tales ejemplos, la interacción de un agente bioactivo (por ejemplo, uno identificado a través de un ensayo fenotípico o cribado) con toda la biblioteca de dianas celulares puede interrogarse (por ejemplo, en solución, en lisados, intracelularmente, etc.) de una manera de alto rendimiento. En algunos ejemplos, las dianas celulares marcadas con indicador bioluminiscente se inmovilizan en una superficie sólida para crear una matriz de proteínas. Por ejemplo, además del indicador bioluminiscente, las dianas celulares también se expresan como fusiones con un marcador o acopladas a una proteína (por ejemplo, HALOTAG, Promega) que permite que las proteínas se inmovilicen covalentemente en una superficie sólida (por ejemplo, una superficie que muestra los ligandos apropiados (por ejemplo, ligando HALOTAG)). En determinadas realizaciones, se añade una biblioteca de agentes bioactivos potenciales (por ejemplo, compuestos coincidentes o moléculas pequeñas de tipo fármaco) al sistema (por ejemplo, matriz) y se identifican los pares capaces de producir BRET. En algunos ejemplos, se desconocen las dianas celulares para toda o una porción de una biblioteca de agentes bioactivos.

En determinados ejemplos, las composiciones, los métodos y los sistemas en el presente documento proporcionan un conjugado de un agente bioactivo y un aceptor de energía (por ejemplo, fluoróforo, cromóforo). En algunos ejemplos, un agente bioactivo es cualquier molécula pequeña (por ejemplo, > 2.000 Dalton, > 1.000 Dalton, > 500 Dalton, etc.), macromolécula, molécula sintética o complejo molecular capaz de interactuar con la biología de una célula. En algunos ejemplos, un aceptor de energía es una entidad capaz de generar, exhibir y/o emitir una señal (por ejemplo,

luz, calor, reacción química, fluorescencia, energía de resonancia, etc.) cuando se activa por absorción de energía (por ejemplo, transferencia de energía de resonancia). En algunos ejemplos, un agente bioactivo y aceptor de energía (por ejemplo, fluoróforo, cromóforo) están fusionados, fijados, conectados, etc., por cualquier estructura o mecanismo adecuado (por ejemplo, expresado como una construcción de fusión (por ejemplo, con o sin enlazador peptídico),
 5 unidos químicamente (por ejemplo, directa o indirectamente), unidos enzimáticamente, unidos a través de un enlazador (por ejemplo, péptido, ácido nucleico, polímero, enlace éster, enlazador PEG, cadena de carbono, etc.)). En algunas realizaciones, el conjugado de un agente bioactivo y un aceptor de energía (por ejemplo, agente bioactivo fijado a un fluoróforo) es producido por síntesis química no natural (por ejemplo, una ejecución intencionada de reacciones químicas que no están presentes en las células naturales). El tipo de enlace no debe verse como limitante.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente bioactivo" se refiere generalmente a cualquier sustancia fisiológica o farmacológicamente activa o una sustancia adecuada para la detección. En algunos ejemplos, un agente bioactivo es un compuesto terapéutico potencial (por ejemplo, molécula pequeña, péptido, ácido nucleico, etc.), o molécula de tipo fármaco. En algunos ejemplos, el agente bioactivo es producido por síntesis química no natural (por ejemplo, una ejecución intencionada de reacciones químicas que no están presentes en las células naturales). Los agentes bioactivos para su uso en las realizaciones descritas en el presente documento no están limitados por tamaño o estructura.

20 En determinadas realizaciones, se proporcionan bibliotecas de agentes bioactivos (por ejemplo, > 10 agentes, >50 agentes, >100 agentes, >500 agentes, >1.000 agentes, >5.000 agentes, >10.000 agentes, >50.000 agentes, etc.). En algunas realizaciones, se proporcionan sistemas, métodos y composiciones para seleccionar bibliotecas de agentes bioactivos. También se desvelan en el presente documento medios para identificar el agente bioactivo en una biblioteca responsable de producir, provocar, inducir, etc. efecto fenotípico y/o actividad. También se desvelan en el presente documento medios para identificar la diana celular de un agente bioactivo (por ejemplo, un agente bioactivo responsable del efecto fenotípico y/o actividad).

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "aceptor de energía" se refiere a cualquier molécula pequeña (por ejemplo, cromóforo), macromolécula (por ejemplo, proteína autofluorescente, ficobiliproteínas, nanopartícula, superficie, etc.), o complejo molecular que produce una señal fácilmente detectable en respuesta a la absorción de energía (por ejemplo, transferencia de energía de resonancia). En determinados ejemplos, un aceptor de energía es un fluoróforo u otro cromóforo detectable. Entre los fluoróforos adecuados se incluyen, pero sin limitación: derivados de xanteno (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, verde Oregón, eosina, rojo Texas, etc.), derivados de cianina (por ejemplo, cianina, indocarbocianina, oxacarbocianina, tiacarbocianina, merocianina, etc.), derivados de naftaleno (por ejemplo, derivados de dansilo y prodan), derivados de oxadiazol (por ejemplo, piridiloxazol, nitrobenzoxadiazol, benzoxadiazol, etc.), derivados de pireno (por ejemplo, azul en cascada), derivados de oxazina (por ejemplo, rojo Nilo, azul Nilo, violeta de cresilo, oxazina 170, etc.), derivados de acridina (por ejemplo, proflavina, naranja de acridina, amarillo de acridina, etc.), derivados de arilmetina (por ejemplo, auramina, cristal violeta, verde malaquita, etc.), derivados de tetrapirrol (por ejemplo, porfina, ftalocianina, bilirrubina, etc.), colorante CF (Biotium), BODIPY (Invitrogen), ALEXA FLuoR (Invitrogen), DYLIGHT FLUOR (Thermo Scientific, Pierce), ATTO y TRACY (Sigma Aldrich), FluoProbes (Interchim), DY y MEGASTOKES (Dyomics), colorantes SULFO CY (CYANDYE, LLC), colorantes SETAU y SQUARE (SETA BioMedicals), colorantes QUASAR y CAL FLUOR (Biosearch Technologies), colorantes SURELIGHT (APC, RPE, PerCP, Ficobilisomas) (Columbia Biosciences), APC, APCXL, RPE, BPE (Phyco-Biotech), proteínas autofluorescentes (por ejemplo, YFP, RFP, mCherry, mKate), nanocristales de puntos cuánticos, etc. En algunas realizaciones, un fluoróforo es un análogo de rodamina (por ejemplo, análogo de carboxirodamina), tales como los descritos en el documento WO2013/078244. Algunos de estos fluoróforos se describen en el presente documento en el Ejemplo 8. En algunos ejemplos, la eficiencia BRET se ve significativamente mejorada por las características técnicas del análogo de rodamina (por ejemplo, análogo de carboxirodamina) como un aceptor de energía en comparación con otros fluoróforos. Por ejemplo, la CE₅₀ desplazada hacia la izquierda y el fondo no específico reducido de estos colorantes es ventajoso para su uso en algunas realizaciones.

50 Tal como se usa en el presente documento, Los términos "TOM" y "NonChloroTOM" (o "NCT") se refieren al mismo tipo de fluoróforo y se usan indistintamente en toda la aplicación.

55 En determinados ejemplos, las composiciones, Los métodos y sistemas del presente documento proporcionan una fusión de una diana celular y una proteína indicadora bioluminiscente (por ejemplo, luciferasa). En algunos ejemplos, una diana celular y una proteína indicadora bioluminiscente están fusionadas, fijadas, conectadas, etc. por cualquier estructura o mecanismo adecuado (por ejemplo, expresado como una construcción de fusión (por ejemplo, con o sin enlazador peptídico), unidas químicamente (por ejemplo, a través de enlaces covalentes o no covalentes), unidos enzimáticamente, unidos a través de un enlazador (por ejemplo, péptido, ácido nucleico, otro polímero (por ejemplo, enlace éster, enlazador PEG, cadena de carbono, etc.)). En algunos ejemplos, se usa una cadena de aminoácidos (por ejemplo, 3-100 aminoácidos) para conectar la diana celular y una proteína indicadora bioluminiscente. En algunos ejemplos, la estructura y/o la función de la diana celular ni del indicador bioluminiscente se ven afectadas (por ejemplo, significativamente afectadas) por fusión o la presencia del enlazador. En determinados ejemplos, un enlazador permite la fusión sin pérdida de actividad o uno o ambos elementos. En otros ejemplos, un enlazador de aminoácidos separa y/u orienta adecuadamente al bioluminiscente indicado para la transferencia de energía con el fluoróforo.

En algunos ejemplos, una diana celular comprende cualquier compañero de unión/interacción adecuado (por ejemplo, receptor, enzima, complejo proteico) para un agente bioactivo (por ejemplo, molécula pequeña, proteína, ácido nucleico, lípido, etc.). Sin embargo, en algunos ejemplos, no se requiere conocimiento de la interacción entre una diana celular y un agente bioactivo para practicar la invención. En ejemplos concretos, una diana celular es una proteína o complejo de proteínas que se une o interacciona con (por ejemplo, tiene una afinidad de unión a) un agente bioactivo. En ejemplos más particulares, una diana celular es una proteína receptora o una enzima que se une o interacciona de otra manera (por ejemplo, tiene una afinidad de unión) con un agente bioactivo de molécula pequeña. La presente divulgación no está limitada por la identidad, el tipo o la clase de dianas celulares. En determinados ejemplos, las bibliotecas de cientos, miles, decenas de miles, dianas celulares más diferentes encuentran uso en la presente invención. Los ejemplos de dianas celulares pueden incluir ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN o ARN), polisacáridos o un complejo que comprende cualquiera de estos con polipéptidos. En algunas realizaciones, una diana celular es un receptor acoplado a proteína G o una proteína quinasas.

En determinadas realizaciones, el indicador bioluminiscente es una luciferasa. En algunas realizaciones, se selecciona una luciferasa de las que se encuentran en *Gaussia*, *Coleoptera*, (por ejemplo, luciérnagas), Renilla, Vargula, *Oplophorus*, *Aequoria*, mutantes de los mismos, partes de los mismos, variantes de los mismos, y cualquier otra enzima luciferasa adecuada para los sistemas y métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína indicadora bioluminiscente es una enzima luciferasa modificada, mejorada de *Oplophorus* (por ejemplo, enzima NANOLUC de Promega Corporation, SEQ ID NO: 1, o una secuencia con una identidad de al menos un 70 % (por ejemplo, >70 %, >80 %, >90 %, > 95 %) con la misma). En algunas realizaciones, la proteína indicadora bioluminiscente es una luciferasa termoestable de *Photuris pennsylvanica* o una secuencia con una identidad de al menos un 70 % (por ejemplo, > 70 %, >80 %, >90 %, > 95 %) con la misma). Se describen indicadores bioluminiscentes de ejemplo, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2010/0281552 y la solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2012/0174242.

En algunas realizaciones, la proteína indicadora bioluminiscente comprende NANOLUC (véase la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2010/0281552 y 2012/0174242). En algunas realizaciones, la proteína indicadora bioluminiscente comprende un polipéptido con al menos un 70 % de identidad (por ejemplo, > 70 %, >80 %, >90 %, >95 %) con la SEQ ID NO: 1 que retiene las características bioluminiscentes. En determinados ejemplos, el uso de la enzima NANOLUC, o una variante de la misma, proporciona características (por ejemplo, intensidad de señal, brillo, alta salida de luz, espectro estrecho, etc.) que permiten el uso de los ensayos BRET descritos en el presente documento. En algunos ejemplos, la alta salida de luz de NANOLUC permite la baja concentración (por ejemplo, <1 µM, <100 nM, <10 nm, <1 nm, etc.) de componentes del ensayo, por ejemplo, ADN que codifica NANOLUC, útil para realizar ensayos en condiciones fisiológicamente relevantes. En algunos ejemplos, NANOLUC permite el uso de BRET en la caracterización de dianas celulares identificadas en un cribado fenotípico.

En algunos ejemplos, se proporciona un sustrato para la proteína indicadora bioluminiscente. En algunos ejemplos, la proteína indicadora bioluminiscente convierte el sustrato en un producto de reacción y libera energía luminosa como subproducto. En algunos ejemplos, el sustrato es un sustrato para una enzima luciferasa. En algunos ejemplos, el sustrato es una variante estructural o derivado de coelenterazina (por ejemplo, furimazina). En algunos ejemplos, el sustrato es un sustrato para una enzima luciferasa modificada mejorada de *Oplophorus*, por ejemplo, enzima NANOLUC de Promega Corporation (por ejemplo, SEQ ID NO:1). En algunos ejemplos, se proporciona un prosustrato para la proteína indicadora bioluminiscente, que produce un sustrato a través de un proceso químico o físico (por ejemplo, hidrólisis, reacción enzimática, foto-escisión, etc.). En algunos ejemplos, el prosustrato comprende coelenterazina, un derivado de coelenterazina, un equivalente estructural o funcional de coelenterazina, una molécula sustancialmente equivalente a la coelenterazina (por ejemplo, estructural y/o funcionalmente), o una molécula funcional o estructuralmente similar a la coelenterazina. En algunos ejemplos, la proteína indicadora bioluminiscente convierte la coelenterazina, el derivado de coelenterazina, el equivalente estructural o funcional de coelenterazina, o el equivalente sustancial de coelenterazina en coelenteramida, un derivado de coelenteramida, un equivalente estructural o funcional de coelenteramida, o un equivalente sustancial de coelenteramida y libera energía luminosa como subproducto.

En algunas realizaciones, el fluoróforo y el indicador bioluminiscente se seleccionan para mostrar una superposición suficiente de emisión (por ejemplo, del indicador bioluminiscente) y los espectros de excitación (por ejemplo, del fluoróforo) para proporcionar una transferencia de energía eficiente entre los dos (por ejemplo, mediante acoplamiento dipolo-dipolo no radiativo). En algunos ejemplos, el pico de emisión del indicador bioluminiscente está sustancialmente separado del pico de emisión del fluoróforo, por ejemplo, en al menos 80 nm, 100 nm, 120 nm, 140 nm, etc., en longitud de onda. En ejemplos concretos, la distancia de Forster del par fluoróforo e indicador bioluminiscente es pequeña (por ejemplo, <20 nm, <10 nm, <5 nm, <3 nm, etc.). En tales ejemplos, la corta distancia de Forster da como resultado el requisito de que el fluoróforo y el indicador bioluminiscente deben estar muy cerca para que se produzca la transferencia de energía. Por consiguiente, la corta distancia de Forster reduce la señal aberrante y/o de fondo (por ejemplo, creada al difundir fluoróforo y/o indicador).

En determinados ejemplos, se seleccionan un par de fluoróforo e indicador bioluminiscente que son lo suficientemente brillantes como para permitir la detección de la señal transferida en una abundancia nativa (o cerca de la abundancia nativa) de la proteína de interés y/o la diana celular fusionada al indicador bioluminiscente. En algunos ejemplos, si el

fluoróforo o el indicador bioluminiscente seleccionados producen una emisión de energía (luz) insuficiente, la fusión de la diana celular y el indicador bioluminiscente deberá sobreexpresarse (por ejemplo, más allá de la abundancia nativa, más allá de un nivel biológicamente relevante, etc.), y/o la cantidad de agente bioactivo fijado al fluoróforo tendrá que incrementarse (por ejemplo, a un nivel potencialmente tóxico, más allá de un nivel fisiológicamente relevante, por encima de la cantidad cuando se pueden realizar experimentos cinéticos, etc.). En algunos ejemplos, el brillo suficiente del indicador bioluminiscente y el fluoróforo permite la detección del agente bioactivo y la interacción de la diana celular en un intervalo de concentraciones y relaciones.

En algunos ejemplos, las composiciones, los métodos y sistemas se proporcionan para la identificación de las dianas celulares de los compuestos coincidentes que emergen de un ensayo fenotípico o cribado fenotípico. En algunos ejemplos, tras la identificación de agentes bioactivos capaces de provocar un fenotipo, los "compuestos coincidentes" fijados a los fluoróforos se usan para identificar dianas celulares, a través de su enlace con una proteína indicadora de bioluminiscencia (por ejemplo, la unión del agente bioactivo a la diana celular da como resultado BRET entre la proteína indicadora de bioluminiscencia y el fluoróforo). En tales ejemplos, aunque un fenotipo se ha asociado con un agente bioactivo particular, el compañero de interacción (por ejemplo, diana celular) para ese agente bioactivo es desconocido o es incierto. En algunos ejemplos, un agente bioactivo fijado a un fluoróforo puede regenerar un fenotipo, validando así que la fijación del agente bioactivo al fluoróforo (o la diana celular al indicador bioluminiscente) no afecta a los patrones de unión celular y/o interrumpe su actividad biológica. En algunos ejemplos, el uso de una biblioteca de dianas celulares, cada una fusionada con la proteína indicadora bioluminiscente (por ejemplo, NANOLUC), proporciona menos interferencia debido a la baja solubilidad o baja abundancia nativa de la diana celular en comparación con otros métodos de detección (por ejemplo, análisis de espectrometría de masas). En algunos ejemplos, dicho método de detección proporciona un mayor grado de sensibilidad o especificidad. En algunos ejemplos, la identificación de la diana mediante el enlace a una proteína indicadora de bioluminiscencia permite la detección a través de la transferencia de energía, incluso cuando la unión de la diana es ineficiente o incompleta. En algunas realizaciones, la unión de un agente bioactivo (por ejemplo, una molécula pequeña) a una diana celular se caracteriza mediante un ensayo de unión competitiva (véase la Figura 1C y 1D). En algunos ejemplos, BRET permite el análisis de la afinidad de unión del compuesto coincidente en células vivas utilizando el desplazamiento competitivo de un trazador fluorescente (por ejemplo, fluoróforo) que se une al mismo sitio en la diana celular. En algunos ejemplos, los sistemas y métodos descritos en el presente documento proporcionan la capacidad de usar dos métodos distintos para la identificación de la diana, proporcionando así una mayor rigurosidad para identificar dianas celulares, los métodos complementarios que abordan las limitaciones con otros enfoques (por ejemplo, BRET proporciona la ventaja de mantener el agente bioactivo en equilibrio con la diana durante todo el experimento).

Algunas realizaciones descritas en el presente documento encuentran uso en el descubrimiento de fármacos, validación de fármacos, descubrimiento de dianas farmacológicas o validación de dianas farmacológicas. En determinados ejemplos, se puede detectar, validar y/o caracterizar la interacción de unión entre un agente bioactivo (por ejemplo, una molécula pequeña similar a un fármaco) y una diana celular. En algunos ejemplos, la afinidad de unión relativa de los agentes bioactivos por una diana celular (por ejemplo, en solución, en un lisado, en una superficie, en una célula, etc.), puede determinarse por su capacidad para desplazar un agente bioactivo que ha sido fijado a un fluoróforo. Específicamente, una mayor afinidad de unión de un primer agente bioactivo con respecto a un segundo agente bioactivo se indica al requerir una concentración más baja del primer agente bioactivo para desplazar un agente bioactivo fijado en relación con el segundo agente bioactivo. El desplazamiento del agente bioactivo fijado está determinado por la pérdida o reducción de la transferencia de energía de la proteína indicadora bioluminiscente fusionada a una diana celular. En algunos ejemplos, la concentración de agente bioactivo necesaria para desplazar un agente bioactivo fijado se usa para estimar la CE_{50} de unión o la constante de inhibición (K_i) para el agente bioactivo. En algunos ejemplos, el desarrollo de agentes bioactivos nuevos o modificados se guía por su capacidad para desplazar uno o más agentes bioactivos, cada uno fijado a un fluoróforo, de una o más dianas celulares, cada una fusionada a una proteína indicadora bioluminiscente.

En algunos ejemplos, una colección de compuestos que pueden tener una afinidad de unión desconocida con un objetivo celular puede analizarse por su capacidad para unir el objetivo fusionado a una proteína bioluminiscente determinando su capacidad de desplazar un agente bioactivo fijado a un fluoróforo. En algunos ejemplos, los compuestos pueden seleccionarse por su capacidad para unirse a una primera diana celular preferentemente en relación con una segunda diana celular por su capacidad de desplazar un primer agente bioactivo fijado desde la primera diana celular en relación a un segundo agente bioactivo fijado desde la segunda diana bioactiva. En algunos ejemplos, el primero y segundo agentes bioactivos fijados son iguales.

En algunos ejemplos, los sistemas y métodos descritos en el presente documento proporcionan la capacidad de determinar la afinidad de un agente bioactivo (por ejemplo, compuesto coincidente, hilo de investigación, compuesto principal, etc.) para versión o versiones de tipo salvaje y mutantes de una diana celular, por ejemplo, proteína diana. En algunos ejemplos, la caracterización de la afinidad y la selectividad del agente bioactivo marcado con fluorescencia (por ejemplo, fármaco) a una proteína mutante relevante para la enfermedad puede realizarse en las células. Dichos sistemas y métodos pueden ser útiles para identificar uno o más agentes bioactivos (por ejemplo, fármaco) que se unen selectivamente a una proteína de tipo salvaje o mutante de forma diferencial.

Además de las dianas principales, las dianas previstas y/o dianas conocidas, los agentes bioactivos (por ejemplo,

compuestos coincidentes) también pueden unirse a dianas celulares inesperadas y/o no deseadas (aparte de las dianas). En algunos casos, la unión fuera de la diana de un agente bioactivo es responsable de una parte de los efectos terapéuticos y/o adversos asociados con la administración del agente bioactivo. En algunos ejemplos, los sistemas y métodos descritos en el presente documento proporcionan la capacidad para identificar las no dianas de un agente bioactivo. Comprender la identidad y el alcance de la unión del agente bioactivo fuera de la diana proporciona información valiosa sobre la farmacología del agente.

En algunos ejemplos, los sistemas y métodos descritos en el presente documento proporcionan la capacidad de estimar las características de unión de un agente bioactivo fijado con un fluoróforo a una diana celular fusionada a un indicador bioluminiscente (por ejemplo, CE50, K_d , velocidad de unión, influencias medioambientales, etc.) En algunos ejemplos, las características de unión se correlacionan con las características bioquímicas, físicas o fenotípicas relacionadas con la diana celular. En algunos ejemplos, el perfil cinético de la formación o disolución del complejo BRET se puede utilizar para inferir las velocidades de asociación o disociación de los agentes bioactivos no fijados. En algunos ejemplos, estas velocidades de asociación/disociación se pueden utilizar para estimar los tiempos de residencia del fármaco para dianas individuales dentro de las células intactas. En algunos ejemplos, los sistemas y métodos son útiles en estudios de mecanismo de acción molecular termodinámico (MMOA) sobre interacciones entrópicas frente a entálpicas. En algunos ejemplos, el desplazamiento del agente bioactivo fijado por un agente separado puede producirse a través de sitios separados en la diana celular. En algunos ejemplos, las características de unión del agente bioactivo fijado pueden usarse para determinar la influencia de la modificación postraduccional (por ejemplo, escisión, fosforilación, metilación, acetilación, lipidación, etc.), translocación intracelular (por ejemplo, movimiento hacia un núcleo, mitocondrias, membrana, etc.), o interacción de proteínas (por ejemplo, interacciones con otras proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) en la diana celular. Un ejemplo es determinar las características de unión de un anticuerpo a una diana celular por su influencia en las características de unión del agente bioactivo fijado. En algunos ejemplos, las características de unión del agente bioactivo fijado pueden usarse para determinar la influencia de las modificaciones químicas o la transformación del agente bioactivo o el fluoróforo fijado (por ejemplo, metabolismo intracelular, cambio en estado iónico, etc.).

En algunos ejemplos, la diana celular puede comprender más de un componente molecular. Por ejemplo, la diana puede comprender más de un polipéptido y además puede comprender otras moléculas naturales o sintéticas (por ejemplo, grupos prostéticos, cofactores, metabolitos, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, etc.). En algunos ejemplos, un agente bioactivo fijado a un fluoróforo se une a un primer componente molecular, y un indicador bioluminiscente se fusiona a un segundo componente molecular, de modo que se produce una señal del agente bioactivo fijado cuando se une al primer componente molecular y el primer componente molecular está muy cerca del segundo componente molecular.

A priori no es necesario conocer la existencia de una interacción entre un agente bioactivo y la diana celular para practicar la invención. En algunos ejemplos, se proporciona detección y/o caracterización de una interacción desconocida o no identificada previamente por transferencia de energía. Las ventajas de los sistemas, composiciones y métodos descritos en el presente documento, sobre otros métodos de descubrimiento de dianas pueden incluir: una amplia gama de posibles concentraciones de agente bioactivo porque (en algunos ejemplos) no es necesaria su expresión dentro de las células (por ejemplo, permite la adición de suficiente fluoróforo aceptor para generar una señal detectable), concentración de proteína natural de la diana celular (por ejemplo, no hay necesidad de sobreexpresión para obtener suficiente señal para la detección), señal detectable en un lector de placas (por ejemplo, detección de alto rendimiento, no es necesaria la imagen), detección de interacciones dentro de una célula, etc.

En algunos ejemplos, los agentes bioactivos (por ejemplo, compuestos coincidentes) se conjugan con un colorante aceptor de energía fluorescente y, por lo tanto, la unión del agente modificado a su diana celular fusionada con luciferasa (por ejemplo, fusionada a NANOLUC) da como resultado la transferencia de energía de NANOLUC al colorante aceptor. Tal sistema proporciona un ensayo homogéneo que se puede realizar en células vivas. En algunos ejemplos, el agente bioactivo marcado permanece en equilibrio con la diana celular durante todo el experimento, lo que permite la detección de dianas que interaccionan con los compuestos coincidentes con baja afinidad. En algunos ejemplos, BRET permite mediciones de afinidad de unión en células vivas mediante el desplazamiento competitivo de un trazador fluorescente diseñado para el mismo sitio de unión.

En algunos ejemplos, la eficiencia BRET se ve significativamente mejorada por las características técnicas de NANOLUC como donante de energía en comparación con otras luciferasas. Por ejemplo, NANOLUC es significativamente más brillante que otras luciferasas de uso habitual para BRET, lo que permite cuantificar la transferencia de energía a niveles de expresión más bajos que son más adecuados para mantener una biología relevante dentro de una célula. En algunos ejemplos, el estrecho espectro de emisión de NANOLUC aumenta el intervalo dinámico al reducir el cruce espectral en el canal aceptor. En algunos ejemplos, el intervalo dinámico se puede aumentar aún más mediante el uso de aceptores de longitud de onda larga que emiten en la región del rojo cercano del espectro (600 a 650 nm). En algunos ejemplos, La evaluación de múltiples ligandos de colorante durante el desarrollo de las realizaciones de la presente invención reveló que los análogos de rodamina (por ejemplo, el análogo de carboxirodamina), tales como los descritos en el documento WO2013/078244, ofrece un intervalo dinámico óptimo para su uso con NANOLUC y/o en las aplicaciones BRET descritas en el presente documento.

PARTE EXPERIMENTAL**Ejemplo 1**

5 Se realizaron experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar el rendimiento mejorado de los conjugados trazadores de PBI y se compararon con los conjugados con colorantes estándar para aplicaciones de trazadores de fármacos. En este ejemplo, los conjugados de ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), un inhibidor de la histona desacetilasa 6 (HDAC6) y un colorante PBI (SAHA-TOM (PBI-4968); véase la figura 8) o colorante estándar (SAHA-TAMRA (PBI-4967); véase la figura 8) se utilizaron en un ensayo BRET intracelular utilizando una proteína de fusión NanoLuc-HDAC (SEQ ID NO:3).

15 Las células HEK293 se transfectaron usando FuGene HD (Promega Corp.) con ADN plasmídico que codifica una proteína de fusión NanoLuc-HDAC6. El ADN DE NanoLuc-HDAC6 se diluyó 1:1000 con un ADN vehículo sin promotor (pGEM3Z) para producir una concentración final de ADN total de 50 ng/pocillo en formato de placa de 96 pocillos (a una densidad de siembra de 20.000 células/pocillo). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se incubaron después con un trazador diluido en serie en presencia o ausencia de un exceso molar de SAHA no marcado (como control de la especificidad). Después del equilibrio con los trazadores de fármacos, se añadió furimazina (un sustrato derivado de coelenterazina para NanoLuc; Promega Corp.) a una concentración de 20 μ M, y el BRET se cuantificó en un luminómetro Varioskan. La señal BRET específica se calculó restando la señal no específica (en presencia de SAHA sin marcar) de la señal generada solo por el trazador SAHA.

25 Los resultados en la figura 2 demuestran que el conjugado/trazador SAHA-TOM (PBI-4968) generó una señal superior específica de BRET en comparación con SAHA-TMR (PBI-4967) y también generó un valor de CE_{50} desplazado a la izquierda para la unión dentro de las células vivas. Como conjugado de fármaco para aplicaciones BRET, el beneficio del colorante PBI-4968 TOM sobre otros fluoróforos de uso habitual se puede aplicar a ensayos de unión competitiva o detección de identificación de dianas (proteómica química) utilizando bibliotecas de proteínas de fusión NANOLUC.

30 Si bien este ejemplo demuestra la unión de un trazador de fármacos a una diana de alta afinidad conocida, en otras realizaciones, dicho trazador se combina con una biblioteca de proteínas de fusión NANOLUC para perfilar afinidades y especificidades relativas a fármacos en familias de dianas. En tales ejemplos, los esfuerzos de elaboración de perfiles ayudan en la identificación de fármacos con perfiles de unión promiscuos, que puede correlacionarse con los efectos secundarios indeseables del fármaco *in vivo*.

Ejemplo 2

35 Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar el beneficio inesperado de niveles bajos de expresión de NanoLuc para aplicaciones BRET.

40 A) Las células HEK293 se transfectaron usando Fugene HD con cantidades variables de ADN NanoLuc-HDAC6 y se sembraron en un formato de placa de 96 pocillos. Para la transfección, el ADN de NanoLuc-HDAC6 se diluyó con ADN vehículo sin promotor (pGEM3Z). La concentración final de ADN/pocillo permaneció en 50 ng/pocillo; no obstante, el ADN de NanoLuc-HDAC6 se diluyó a 1:10, 1:100 y 1:1000 (a una densidad de siembra de 20.000 células/pocillo en formato de 96 pocillos). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con SAHA diluido en serie en presencia de una concentración fija (1 μ M) de SAHA-TOM (PBI-4968; véase la figura 8) conjugado. Después de dos horas de incubación, se añadió furimazina a 20 μ M y se detectó BRET en un luminómetro Varioskan. Los resultados en la figura 3 demuestran que se requirió una dilución inesperadamente alta de ADN que codifica la fusión NanoLuc para lograr la señal adecuada de fondo para las aplicaciones BRET.

45 B) El ADN que codifica una proteína de fusión NanoLuc-Histamina HI (GPCR) se transfectó en células HEK293 usando cantidades variables de ADN que van desde sin diluir a 1:10.000 (diluido con ADN vehículo sin promotor (pGEM3Z como se ha descrito anteriormente) para mantener una cantidad constante de ADN/transfección como se ha descrito anteriormente). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con mepiramina-bodipy-633 (CellAura) diluido en serie y se equilibraron durante 2 horas. A continuación, se trataron las células con furimazina a una concentración de 20 μ M, y se detectó BRET en un luminómetro Varioskan.

55 Los resultados en la figura 3B indican que se requería una gran dilución de ADN que codifica la fusión NanoLuc para generar una interacción de alta afinidad con una señal de fondo óptima. La capacidad de diluir las proteínas de fusión NanoLuc a niveles extremadamente bajos es beneficiosa en varias aplicaciones BRET, incluyendo ensayos de unión competitiva o detección selectiva de identificación de dianas (proteómica química) de las proteínas de fusión NanoLuc.

Ejemplo 3

60 Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar el valor predictivo de la medición de BRET intracelular para cuantificar la unión de profármacos en comparación con los formatos bioquímicos tradicionales (en función de la actividad). El ejemplo incluye el profármaco natural, FK228, que requiere la activación del ambiente reductor del citoplasma celular y capacidad de unión a HDAC6.

Las células HEK293 se transfectaron con ADN que codifica NanoLuc-HDAC6 a una dilución 1:1000 con ADN vehículo como se ha descrito previamente. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se incubaron con profármacos naturales diluidos en serie, FK-228; en presencia de una concentración fija (1 μM) de conjugado SAHA-TOM (PBI-4968). Para realizar una comparación, se realizó en paralelo un ensayo bioquímico HDAC6 en función de la actividad. Brevemente, se realizó una dilución en serie de 3 veces de FK-228 (n.º S3020 en el catálogo de Selleckchem) a 100X en DMSO al 100 % en pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadió una alícuota de 5 μl de esta serie de titulación 100X/DMSO al 100 % a 245 μl de tampón de ensayo HDAC-Glo™ I/II solo (Promega Corp.) o 245 μl de tampón de ensayo HDAC-Glo™ I/II suplementado con 2X (0,5 mM) de DTT para hacer una serie de titulación intermedia maestra 2X/DMSO al 2 % de FK-228 en pocillos de una placa de 96 pocillos. De esta serie maestra de titulación intermedia, se transfirieron 5 μl de réplicas a los pocillos de una placa de ensayo blanca de 384 pocillos (Corning 3673). A todos los pocillos se añadieron 5 μl de 2X (2 nM) DE HDAC 6 (n.º de catálogo BPS Bioscience 50006) para una concentración final 1 nM de HDAC6/pocillo. Las mezclas de enzima/inhibidor de 10 μl durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se añadió un volumen igual (10 μl) de Reactivo de detección final HDAC-Glo™ I/II (Promega Corp.) a todos los pocillos (20 μl de volumen de ensayo final), y se midió la luminiscencia después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente. Para todas las condiciones de prueba, la concentración final de sustrato HDAC-Glo™ I/II fue de 50 μM . Los datos se representaron (respuesta a la dosis sigmoidal - pendiente variable) usando el software Prism™ de GraphPad (sin DTT: círculos cerrados; DTT 0,25 mM: cuadrados abiertos).

Los resultados en las figuras 4A y 4B indican el requisito del medio celular para medir la unión de profármacos que la célula debe procesar para activarse.

Ejemplo 4

Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar el uso de agentes de permeabilización para introducir trazadores de fármacos impermeables en las células.

Las células HEK293 se transfectaron con ADN que codifica PKCalfa (PKCa)-NanoLuc o NanoLuc-PKCalfa a una dilución de 1:1.000 de ADN con ADN vehículo sin promotor como se ha descrito anteriormente. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con o sin digitonina hasta una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A continuación, las células se trataron con un conjugado de estaurosporina-PBI-colorante diluido en serie (PBI-5129; véase la Figura 8). Las células se incubaron conjuntamente en presencia o ausencia de estaurosporina no conjugada 5 μM como control de especificidad para la unión. Después de dos horas de equilibrio con un trazador, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μM y las proporciones de BRET se midieron en un luminómetro Varioskan (figuras 5A y 5B).

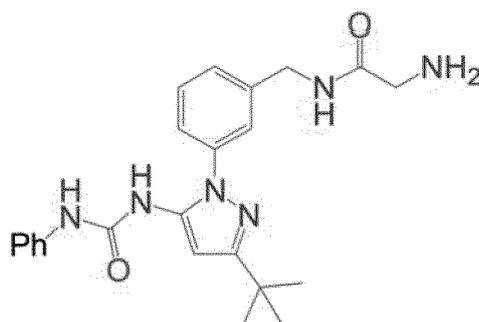
En un segundo experimento, las células PKCa-NanoLuc transfectadas de forma idéntica se trataron con digitonina diluida en serie antes del tratamiento con una concentración fija del trazador estaurosporina-TOM (PBI-5129; véase la figura 8) (concentración final 5 μM) en presencia o ausencia de estaurosporina 5 μM sin marcar (control de especificidad) (figuras 5C).

Las figuras 5A-C demuestran la capacidad de usar el agente de permeabilización para potenciar la entrada de trazadores de fármacos impermeables y se aplican a los cribados proteómicos químicos en función de BRET de las bibliotecas de proteínas de fusión NanoLuc™.

Ejemplo 5

Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar el uso de NanoLuc/BRET para medir afinidades relativas de fármacos en células vivas. En algunos ejemplos, se configuran experimentos similares para optimizar los hilos de los cribados químicos de alto rendimiento.

Las células HEK293 se transfectaron con ADN que codifica una proteína de fusión NanoLuc-p38 (a una concentración final de ADN de 50 ng/pocillo en formato de 96 pocillos). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con BIRB-796 o PBI-4835 diluidos en serie en presencia de PBI-4838 0,5 μM (derivado conjugado de BIRB; véase, por ejemplo, documento WO2013/078244).

**PBI 4835**

Después de dos horas de equilibrio, se añadió furimazina a una concentración de 20 μM y se midió BRET en un luminómetro Varioskan.

5

La figura 6 demuestra que las curvas BRET de dosis-respuesta apoyan la mayor afinidad conocida de BIRB-796 sobre PBI-4835 ("Derivado de BIRB"). La capacidad para medir las afinidades relativas de los fármacos no marcados se puede aplicar a los cribados de HTS, optimización principal o aplicaciones de proteómica química. En algunas realizaciones, se configuran experimentos similares para caracterizar compuestos coincidentes optimizados a partir de cribados químicos de alto rendimiento (por ejemplo, los compuestos con valores de CI_{50} más bajos para el desplazamiento del trazador indicarían una mayor eficiencia de unión a la diana de interés).

10

Ejemplo 6

15

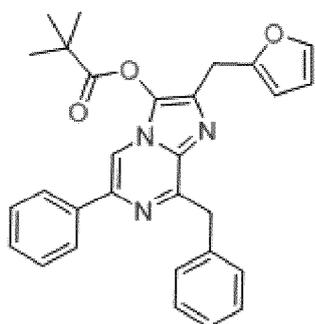
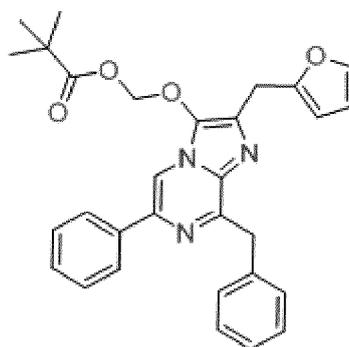
Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar el uso de NanoLuc/BRET para monitorizar la cinética de unión en las células vivas. En algunos ejemplos, se configuran experimentos similares para optimizar los hilos de los cribados químicos de alto rendimiento.

20

Las células HEK293 se transfectaron con ADN que codifica una fusión NanoLuc-p38 (a una concentración final de ADN de 50 ng/pocillo en formato de 96 pocillos). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se pretrataron durante 2 horas con furimazina protegida (PBI-4378; véase la figura 8) hasta una concentración final de 20 μM . La BRET se midió en el tiempo en un luminómetro Varioskan ajustado a 37 $^{\circ}\text{C}$. Después de una breve lectura previa, las células fueron estimuladas con concentraciones variables de PBI-4838 (en presencia o ausencia de BIRB796 1 μM como control de especificidad). La dosis y los aumentos dependientes del tiempo en BRET se monitorizaron cinéticamente durante 4 horas.

25

En un experimento separado, las células transfectadas se pretrataron con PBI-4377 20 μM y PBI-4838 1 μM para generar una señal BRET constante.

**PBI 4378****PBI 4377**

30

Después de una breve lectura previa, las células fueron estimuladas con BIRB-796 1 μM sin marcar y el desplazamiento competitivo se monitorizó mediante BRET en tiempo real.

35

Los resultados en la figura 7A-B apoyan el uso de BRET para mediciones cinéticas del acoplamiento de la diana en células vivas. Dichos formatos pueden explotarse para HTS o la detección de proteómica química de proteínas de fusión NanoLuc en células vivas. En algunos ejemplos, se configuran experimentos similares para caracterizar compuestos principales optimizados a partir de cribado químico de alto rendimiento (por ejemplo, compuestos con

cinética de asociación o disociación alterada respecto a la diana de interés). Además de proporcionar una medida de afinidades relativas del compuesto, tales mediciones cinéticas de BRET podrían permitir evaluaciones cuantitativas del tiempo de residencia diana bioquímicamente o dentro de células intactas

5 Ejemplo 7

El ejemplo siguiente se refiere al uso de sustratos NANOLUC específicos (véase la figura 8) o componentes enzimáticos para discriminar la localización subcelular de un evento de unión a fármacos usando BRET.

10 La separación física de polipéptidos o péptidos enzimáticos NANOLUC complementarios permite el aislamiento de la señal NANOLUC (donante) al espacio extracelular. Por ejemplo, el péptido señal pequeño está fijado genéticamente a un receptor de superficie celular. Tras la adición exógena del polipéptido señal grande al medio celular, la señal del donante está aislada del espacio extracelular. Este aislamiento de señal aumenta la proporción señal/fondo generada en varias aplicaciones BRET, incluida la proporción unión/desplazamiento del trazador de fármacos.

15 En algunos ejemplos, se utilizan fusiones de proteína NANOLUC de longitud completa si se aplica un sustrato NANOLUC impermeable.

20 Ejemplo 8

Lo siguiente proporciona esquemas de síntesis para compuestos de ejemplo que encuentran uso en realizaciones de la presente invención.

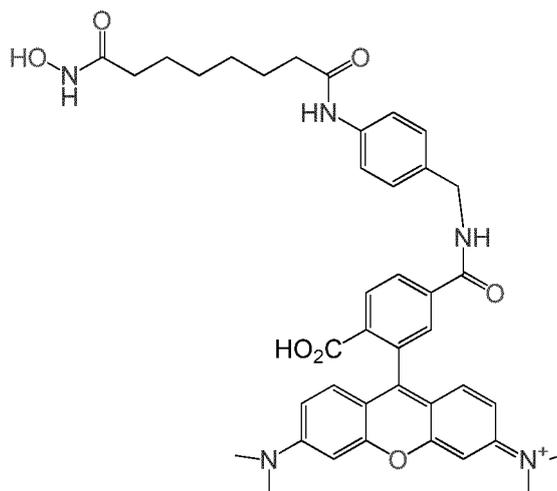
25 SAHA amina protegida con Boc

El ácido 7-tritiloxicarbamoil heptanoico (200 mg, 463 μmol) se combinó con 4-[(N-Boc)aminometil]anilina (113 mg, 510 μmol), HBTU (352 mg, 927 μmol) y trietilamina (194 μl , 1,4 mmol) en 3 ml de DMF. La reacción se agitó durante la noche, a continuación se adsorbió sobre Celite, y el producto se obtuvo por cromatografía en columna eluyendo con un gradiente de 0- \rightarrow 100 % de EtOAc en heptanos. Calculado para M + H: 635,3; observado 635,9

30 SAHA amina

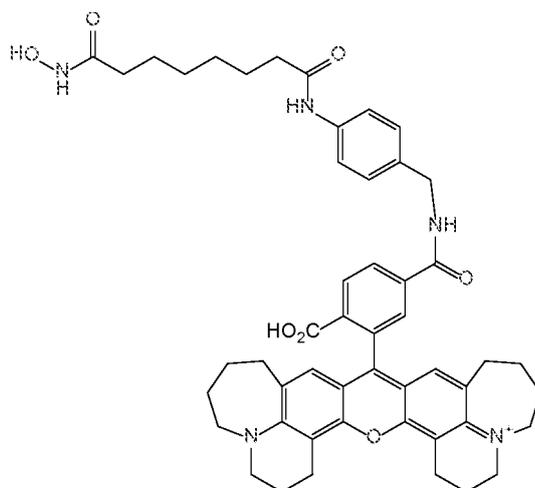
El ácido suberoil(4-[(N-Boc)aminometil]anilida)hidroxámico (286 mg, 450 μmol) se disolvió en 2 ml de DCM al que se añadieron 0,25 ml de TIS. A continuación se añadió ácido trifluoroacético (0,9 ml) y la reacción se agitó durante 30 minutos. Los disolventes se eliminaron a presión reducida, y el producto de reacción en bruto pudo purificarse por HPLC preparativa o usarse sin purificación adicional.

35 PBI-4967 SAHA-TAMRA



40 El producto bruto de la reacción del ácido suberoil[4-(aminometil)anilida]hidroxámico (27 mg) se combinó con 4 mg (7,6 μmol) de éster de tetrametilrodamina6-succinimidilo en 1 ml de DMF con 5 gotas de TEA. Después de 30 minutos, la reacción se diluyó con H_2O y MeCN, y el producto se aisló por HPLC preparativa (5- \rightarrow 60 % de MeCN en TFA acuoso al 0,1 %). La liofilización de las fracciones apropiadas produjo el producto deseado como un sólido magenta. Calculado para H + H: 706,3; observado 706,6.

45 PBI-4968 SAHA-TOM

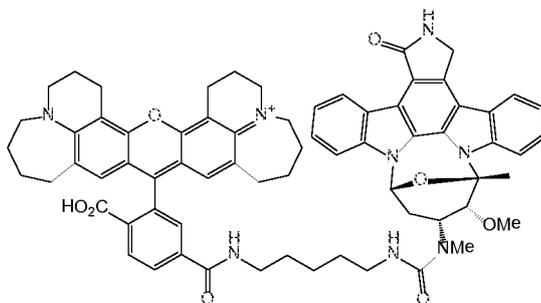


5 El producto de reacción bruto de ácido suberoil[4-(aminometil)anilida]hidroxámico (8 mg) se combinó con 5 mg (7,6 μmol) de éster de 6-succinimidilo TOM en 0,8 ml de DMF con 3 gotas de TEA. Después de 30 minutos, la reacción se diluyó con H_2O y MeCN, y el producto se aisló por HPLC preparativa (5- \rightarrow 60 % de MeCN en TFA acuoso al 0,1 %). La liofilización de las fracciones apropiadas produjo el producto deseado. Calculado para M + H: 838,4; observado 838,7

10 Estaurosporina-amina

10 El p-nitrofenilcarbamato de estaurosporina (3 mg, 4,8 μmol) se disolvió en 0,5 ml de DMF y se trató con un exceso de cadaverina. La reacción se calentó en un baño de aceite a 70 °C durante 2 horas, después se diluyó con H_2O , se acidificó con ácido fórmico y se sometió a HPLC preparativa eluyendo con 25 % \rightarrow 75 % de MeCN en NH_4OAc 10 mM acuoso. Las fracciones apropiadas se liofilizaron para proporcionar un sólido ligeramente amarillo. Calculado para M + H: 595,3; observado 595,5

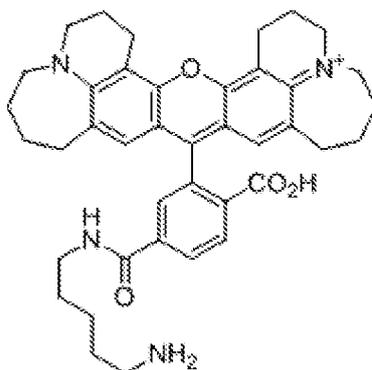
15 PBI-5129 Estaurosporina-TOM



20 Se disolvió 5-aminopentilcarboxamida de estaurosporina (5 mg, 8,4 μmol) en 1 ml de DMF y se trató con trietilamina y TOM 6-SE (4 mg, 6 μmol). La reacción se controló mediante HPLC analítica. Tras finalizar la reacción, se añadieron MeCN y H_2O , y el TEA se neutralizó mediante la adición de una pequeña cantidad de AcOH. La HPLC preparativa (25 % \rightarrow 100 % de MeOH en NH_4OAc 10 mM) y la concentración posterior produjeron 1,8 mg de un sólido azul oscuro. Calculado para M + H: 1139,5; observado 1139,8.

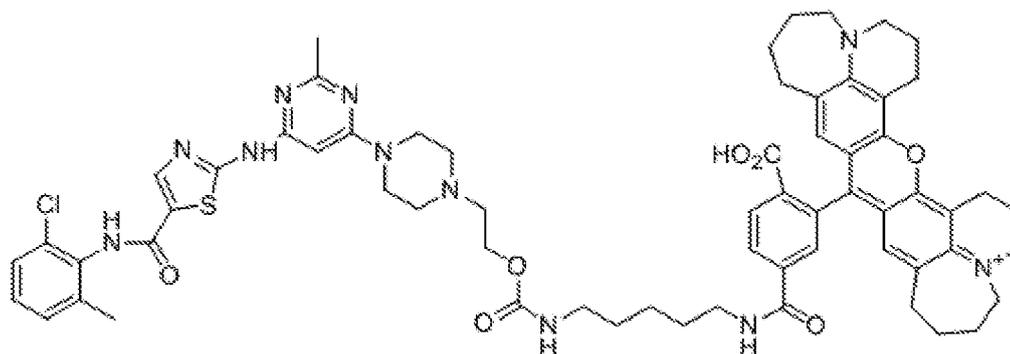
25 Dasatinib-TOM

30 TOM-pentilamina



5 El ácido TOM 6-carboxílico (26 mg, 46 μmol) se agitó en 1 ml de DMF con 2 equivalentes de trietilamina y se trató con TSTU (17 mg, 56,5 μmol , 1,2 equiv), y la reacción se controló mediante HPLC. Después de 40 minutos, la reacción se añadió a una solución de cadaverina (94 mg, 0,92 mmol, 20 equiv.) en 0,5 ml de DMF y se agitó durante 20 minutos. A continuación, la reacción se neutralizó mediante la adición de TFA y se diluyó con MeCN y agua. La HPLC preparativa (25- \rightarrow 100 % de MeCN en TFA acuoso al 0,1 %) y la posterior liofilización proporcionaron el producto deseado como un sólido púrpura. LCMS: Calculado para $((M + 2H)/2)$ 324,4; observado 324,3.

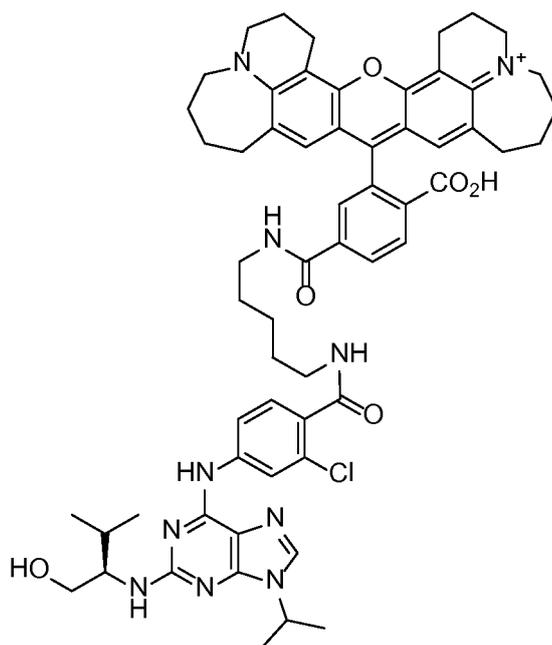
10 Dasatinib-TOM



15 Dasatinib (25 mg, 51 μmol) se combinó con cloroformiato de p-nitrofenilo (14 mg, 69 μmol , 1,36 equiv.) y 30 μl de TEA en 0,9 ml de DMF:THF 2:1. La reacción se agitó durante la noche y luego se añadieron 35 mg de cloroformiato de p-nitrofenilo adicional. Después de agitar durante 24 horas adicionales, el volumen de la reacción se añadió a una solución de 7 mg (10 μmol) de TOM-pentilamina en 0,5 ml de DMF y 30 μl de TEA. A continuación, la reacción se agitó durante 1 hora, seguido de dilución con MeCN y agua y purificación mediante HPLC preparativa. La liofilización proporcionó el producto deseado como un sólido púrpura. MS: Calculado para $((M + 2H)/2)$ 580,8; observado 581,0.

20

Purvalanol-TOM PBI 5077



El purvalanol (10 mg, 23 μmol) se agitó en 1 ml de DMF con 20 mg de TEA (198 μmol) y se trató con 7,7 mg (25,4 μmol , 1,1 equiv) de TSTU. Después de 30 minutos, la reacción se diluyó con Et₂O y la mitad del volumen de reacción total se añadió a un vial que contenía 6 mg (9 μmol) de TOM (5-aminopentil)-6-carboxamida. La reacción se agitó durante 3 horas y los compuestos orgánicos volátiles se eliminaron a presión reducida. La solución de DMF resultante se diluyó con agua y MeCN y se acidificó con TFA, a continuación, el producto se aisló mediante HPLC preparativa (25- \rightarrow 100 % de MeCN en 0,1 % de TFA acuoso) y posterior liofilización para producir 3,5 mg de un sólido púrpura. MS: Calculado para M + H: 1061,5, observado 1061,6.

Ejemplo 9

Uso de Renilla Luciferasa o NanoLuc luciferasa en el método de identificación de compuestos de la presente invención

Las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica NanoLuc-p38alfa o Renilla Luc-p38alfa usando Fugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN a 3:1 y se sembró en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo (para dar 50 ng/pocillo de ADN). 24 horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (OptiMEM) y se incubó con PBI-4838 diluido en serie (derivado DE BIRB796 conjugado con colorante TOM) en presencia/ausencia de BIRB796 a 1 μM . Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μM . A las muestras que expresan Renilla Luc, se añadió coelenterazina nativa a una concentración final de 20 μM . A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450.

La figura 9 demuestra que tanto la Renilla luciferasa como la luciferasa NanoLuc pueden usarse en el método de la presente invención. Tras el tratamiento de las células que expresan NanoLuc-p38alfa o Renilla Luc-p38alfa con PBI-4838 diluido en serie, se observó un incremento de BRET dependiente de la dosis. Las concentraciones saturantes de BIRB-796 sin marcar pueden bloquear esta señal BRET, lo que indica especificidad de unión usando cualquiera de la fusión de luciferasa a p38alfa.

Ejemplo 10

Comparación de TOM-BIRB frente a TMR-BIRB contra NanoLuc-p38 alfa

Como se ha descrito anteriormente, las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica NanoLuc-p38alfa usando Fugene HD y se sembraron en placas de 96 pocillos (para producir 50 ng/pocillo de ADN). 24 horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-4838 diluido en serie (derivado de BIRB796 conjugado con colorante TOM) o PBI-4836 (derivado de BIRB conjugado con colorante TMR) en presencia/ausencia de BIRB796 a 1 μM . Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μM . A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm.

La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450.

La figura 11 demuestra otro ejemplo del aumento de la potencia del aducto de TOM sobre el aducto de TMR para unirse a una proteína diana en un formato basado en células. Las curvas dosis-respuesta para la unión de NanoLuc-p38alfa indican una CE_{50} de 38 nM para el conjugado BIRB-TOM, en comparación con una CE_{50} de 450 nM para el conjugado BIRB-TMR. La afinidad notificada de BIRB-TOM es más consistente con los informes de la bibliografía en comparación con BIRB-TMR (Chem Biol Drug Des 2009; 74: 547-559).

Ejemplo 11

Comparación de BIM-TOM frente a BIM-TMR contra PKCalfa-NanoLuc

Como se ha descrito anteriormente, las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica PKCalfa-NanoLuc (diluido a 1:1000 en ADN vehículo pGEM3Z) usando Fugene HD y se sembraron en placas de 96 pocillos (para producir 50 ng/pocillo de ADN total). 24 horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-5075 diluido en serie (BIM conjugado con colorante TOM) o PBI-5051 (BIM conjugado con colorante TMR) en presencia/ausencia de estaurosporina a 5 μ M. Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μ M. A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450. Para determinar señales BRET específicas, la proporción BRET a cada concentración de trazador + estaurosporina sin marcar se restó de la proporción BRET a cada concentración de trazador sin estaurosporina sin marcar.

La figura 12 demuestra otro ejemplo del aumento de la potencia del aducto de TOM sobre el aducto de TMR para unirse a una proteína diana en un formato de célula permeabilizada. Las curvas dosis-respuesta para la unión PKCalfa-NanoLuc indican una CE_{50} de 483 nM para el conjugado BIM-TOM, en comparación con la potencia desplazada drásticamente hacia la derecha para el conjugado BIM-TMR. La afinidad notificada de BIM-TOM es más consistente con los informes de la bibliografía en comparación con BIM-TMR (J Biol Chem. 25 de agosto de 1991; 266(24):15771-81.).

Ejemplo 12

Identificación de dianas a través de la vía de p38/MAPK-Determinación de la selectividad

El siguiente ejemplo sirve para demostrar la capacidad para perfilar la selectividad de un trazador de fármacos contra un panel de supuestas dianas dentro de una familia de dianas filogenéticas dadas. Se pueden usar configuraciones experimentales similares para identificar la diana de los fármacos marcados con fluorescencia usando BRET en las células. Esta configuración puede conducir a la identificación de la diana farmacológica primaria, así como interactuadores fuera de la diana. El acoplamiento de múltiples dianas puede ser indicativo de promiscuidad del fármaco y posibles efectos secundarios del fármaco. Este ejemplo sirve para demostrar la capacidad para medir las interacciones de la diana tanto primarias como secundarias a través de BRET.

Las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica LAS fusiones NanoLuc en el extremo N o C a varios miembros de la ruta MAPK (Jnk1, Jnk2, Jnk3, p38alfa, p38beta, p38gamma, p38delta, o PKCalfa o MAPK 8, 9, 10, 14, 11, 12 o 13, PKCalfa respectivamente) usando Fugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN de 3:1 y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo (rendimiento 50 ng/pocillo de ADN). Veinticuatro horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-4838 2 μ M en presencia o ausencia de BIRB796 a 4 μ M. Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μ M. A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450. Para determinar las relaciones de respuesta, los valores de BRET con trazador solo se dividieron por los valores de BRET con trazador + BIRB796 no modificado.

La Figura 13 indica la selectividad de PBI-4838 a Jnk2, p38beta y p38alfa, consistente con los informes de la bibliografía. P38alfa es reconocido como la diana primaria de BIRB796. Sin embargo, las interacciones con dianas tales como Jnk2 y p38beta podrían indicar posibles objetivos fuera de la diana. Como cabía esperar, la fusión PKCalfa-NanoLuc combinada con PBI-4838 mostró una señal BRET específica relativamente pequeña debido a la escasa afinidad de BIRB796 por esta diana.

Ejemplo 13

Identificación de la diana a través de la vía p38/MAPK- Determinación de afinidad

El siguiente ejemplo sirve para demostrar la capacidad para perfilar la afinidad de un trazador de fármacos contra un

panel de supuestas dianas dentro de una familia de dianas filogenéticas dada. Se pueden usar configuraciones experimentales similares para caracterizar la afinidad del fármaco marcado con fluorescencia por una diana dada usando BRET en las células.

5 Las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica NanoLuc-p38alfa, NanoLuc-p38beta, Jnk2-NanoLuc, PKCalfa-NanoLuc o NanoLuc-HDAC6 utilizando Fugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN de 3:1 y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo (rendimiento 50 ng/pocillo de ADN). Veinticuatro horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-4838 diluido en serie en presencia o ausencia de BIRB796 a 4 μ M. Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. Para un conjunto separado de muestras, las células transfectadas se trataron con BIRB796 diluido en serie en presencia de PBI-4838 1 μ M. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μ M. A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450.

15 Las figuras 14 y 15 demuestran la aparente afinidad de PBI-4838 por Jnk2, p38beta y p38alfa. Como cabía esperar, PKCalfa y HDAC6 mostraron relativamente poca señal BRET específica debido a la escasa afinidad de PBI-4838 por estas dianas. Adicionalmente, la alta afinidad de BIRB796 por Jnk2, p38alfa, y p38beta se demuestra por desplazamiento competitivo en las células. Experimentos similares podrían configurarse para ordenar en orden de rango la afinidad de los trazadores de fármacos por un conjunto determinado de dianas (por un aumento en BRET) o fármacos no modificados (por desplazamiento competitivo). Como se ha indicado anteriormente, las interacciones de alta afinidad con las dianas, tales como Jnk2 y p38beta, podrían indicar posibles objetivos fuera de la diana.

25 Ejemplo 14

Determinación de afinidad de un trazador de fármacos para la proteína diana de tipo salvaje frente a la mutante

30 El siguiente ejemplo sirve para demostrar la capacidad para medir la afinidad relativa de un trazador de fármacos por una proteína diana de tipo salvaje frente a la mutante. En este ejemplo, se determinó la afinidad de un compuesto iBET marcado con fluorescencia (inhibidor de molécula pequeña que se une a BRD4 impidiendo su interacción con histonas acetiladas) para la versión mutante y de tipo salvaje (N140A/N433A; carece de la capacidad de unión total a iBET) de BRD4 (proteína 4 que contiene bromodominio). Se pueden usar configuraciones experimentales similares para caracterizar la afinidad y selectividad del fármaco marcado con fluorescencia por una proteína mutante relevante para la enfermedad en las células. Tales experimentos pueden ser útiles para identificar fármacos que se unen selectivamente a proteínas de tipo salvaje o mutantes de manera diferencial.

40 Las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica NanoLuc-BRD4 o NanoLuc-BRD4 (N140A/N433A) usando Fugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN de 3:1 y se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo (rendimiento 50 ng/pocillo de ADN). Veinticuatro horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-4966 diluido en serie (iBET conjugado con colorante TOM) en presencia/ausencia de iBET a 10 μ M. Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μ M. A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450.

50 La figura 16 indica las afinidades relativas de PBI-4966 con BRD4 de tipo salvaje frente a BRD4 mutante. Como cabía esperar, se observa una potencia desplazada hacia la derecha con BRD4 mutante que indica una afinidad disminuida por PBI-4966. Se podrían configurar experimentos similares para clasificar el orden de afinidad de los trazadores de fármacos con mutantes relevantes para la enfermedad de una diana. Este principio podría ampliarse para medir las afinidades relativas de los fármacos por las proteínas mutantes o de tipo salvaje mediante el desplazamiento competitivo del trazador. Dado que el aumento de la señal BRET es solo indicativo de unión a la fusión NanoLuc, este método permite medir el acoplamiento de la diana en medio de una mezcla compleja de antígenos similares presentes en la muestra de ensayo. Estos antígenos podrían incluir dianas de propiedades similares, pero no idénticas a la diana de interés (por ejemplo, para discriminar analitos heterólogos frente a endógenos o analito mutante frente a salvaje, etc.).

60 Ejemplo 15

Panel compuesto de cribado para determinar el acoplamiento de la diana

65 El siguiente ejemplo demuestra que el método de la presente invención puede usarse para cribar paneles compuestos para determinar el acoplamiento de la diana. Este método de cribado también podría ampliarse a bibliotecas de compuestos más grandes (por ejemplo, LOPAC).

Las células HEK293 se transfectaron con ADN de NanoLuc-HDAC6 usando Fugene HD y se sembraron en pocillos

de una placa de 96 pocillos. Para la transfección, el ADN de NanoLuc-HDAC6 se diluyó con ADN vehículo sin promotor (pGEM3Z). La concentración final de ADN/pocillo permaneció en 50 ng/pocillo; sin embargo, el ADN de NanoLuc-HDAC6 se diluyó a 1:1000 (a una densidad de siembra de 20.000 células/pocillo en formato de 96 pocillos). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con inhibidores diluidos en serie (véase la figura 17) en presencia de una concentración fija (1 μM) de conjugado SAHA-TOM (PBI-4968). Después de dos horas de incubación, se añadió furimazina a 20 μM y se detectó BRET en un luminómetro Varioskan.

Los resultados en la figura 17 demuestran que los compuestos estructuralmente distintos pueden identificarse mediante desplazamiento competitivo de trazadores de fármacos usando el método de la presente invención. Adicionalmente, se puede confirmar la potencia relativa de varias clases de compuestos. Los resultados indican poca o ninguna eficacia de unión de apicidina a HDAC6 en comparación con la alta eficacia de unión de panabinstat o SAHA a HDAC6. Esto es consistente con los informes de la bibliografía que utilizan formatos de ensayo ortogonales. Este método de cribado podría ampliarse para incluir el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas grandes para identificar/caracterizar nueva materia química con potencial inhibidor contra una diana determinada.

Ejemplo 16

Control de interacciones diana-fármaco

Se acepta comúnmente que ocurre un alto grado de BRET no específico en un medio que contiene una luciferasa en presencia de un fluoróforo de superposición espectral significativa (Couturier 2012). Esto se ha descrito como una responsabilidad por el uso de BRET para cribados químicos de alto rendimiento. El siguiente ejemplo sirve para demostrar la capacidad de controlar las interacciones fármaco/diana utilizando conjugados fluoróforo-fármaco en presencia de una luciferasa, NanoLuc, en medio a intervalos de concentración comúnmente reconocidos como problemáticos para BRET.

Las células HEK293 se transfectaron con ADN plasmídico que codifica CDK2-NanoLuc (diluido a 1:100 en ADN portador de pGEM3Z) usando Eugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN de 3:1 y se sembraron en pocillos de placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo (rendimiento de 50 ng/pocillo de ADN total). Veinticuatro horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-5077 diluido en serie (purvalanol B conjugado con colorante TOM) en presencia/ausencia de Purvalanol B a 10 μM . Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas.

A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μM . A continuación, el BRET se midió en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y de paso largo de 630 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450 (figura 18).

Este ejemplo apoya el uso de trazadores de fluoróforos en medio para controlar las interacciones fármaco/diana mediante BRET. Co-incubando la muestra (+ trazador de fármaco) con purvalanol B (fármaco no modificado), se puede medir la señal BRET no específica entre el NanoLuc y el trazador. Sobre el intervalo de concentración del trazador probado, esta señal BRET de fondo era baja. Estos resultados demuestran que la unión específica entre el trazador del fármaco y la fusión NanoLuc-diana se puede controlar en medio celular a pesar de una superposición espectral significativa entre el NanoLuc (donante) y el fluoróforo (aceptor).

Ejemplo 17

Cribado de ID de diana utilizando matrices de proteínas

El siguiente ejemplo demuestra la capacidad para generar matrices de fusión NanoLuc usando la expresión libre de células y medir la unión al fármaco y la afinidad relativa por BRET.

Un panel de 11 quinasas (fusiones NanoLuc en los extremos N y C) que incluyen supuestas dianas de BIRB796 (tales como miembros de las familias MAPK y Jnk), las supuestas dianas de Dasatinib (tales como Src y LCK), así como un control negativo HDAC6 irrelevante, se expresó en el sistema de transcripción/traducción de reticulocitos de acoplamiento rápido TnT® T7 (Promega Corporation) según lo recomendado por el fabricante para crear una matriz con 23 fusiones NanoLuc diferentes. Cada reacción de TNT® se diluyó a 1:100 en PBS y se sembró en placas replicadas en pocillos de placas de 96 pocillos. La matriz de fusión NanoLuc se cribó con 2 trazadores de fármacos TOM diferentes (BIRB-TOM; **PBI-4838** y Dasatinib-TOM; **PBI-5170**) en presencia y ausencia de exceso de fármaco libre relevante. Para cada reacción TNT®, se realizaron 4 réplicas con BIRB TOM 2 μM /4 réplicas con BIRB-TOM 2 μM + BIRB796 4 μM (total de 2 placas de 96 pocillos) y 4 réplicas con Dasatinib-TOM 1 μM /4 réplicas con Dasatinib-TOM 1 μM + Dasatinib 5 μM (total de 2 placas de 96 pocillos). Las reacciones se incubaron con mezcla constante durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadió furimazina a una concentración final de 20 μM . A continuación se midió el BRET en un luminómetro Varioskan equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y paso largo de 610 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 610 por la señal en el canal 450. Para determinar las relaciones de respuesta, los valores de BRET con trazador solo se dividieron por los valores de BRET con trazador + sin modificar.

Los resultados (Figura 19) demuestran la selectividad del trazador BIRB-TOM para Jnk2, Jnk3, MAPK14, MAPK11 y MAPK13, así como la selectividad del trazador Dasatinib-TOM para ABL1, Src, LCK, MEK5, MAPK11 y MAPK14 consistentes con los informes en la bibliografía. Estos resultados demuestran la capacidad para perfilar el trazador de fármacos frente a un panel de supuestas dianas expresadas en el sistema de expresión libre de células e identificar las coincidencias. Esta configuración de matriz de fusión NanoLuc de proteína sin lavado puede conducir a la identificación de la diana primaria del fármaco, así como interactuadores fuera de la diana.

Siguiendo el cribado anterior, las coincidencias e BIRB-TOM se analizaron adicionalmente para determinar la afinidad de unión al trazador BIRB-TOM y el desplazamiento competitivo del trazador BIRB TOM con el BIRB796. Los experimentos de afinidad de unión al trazador BIRB-TOM se realizaron incubando 3 réplicas de las reacciones de TNT diluidas con el trazador BIRB-TOM diluido en serie en presencia/ausencia de BIRB796 a 10 μ M. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente con mezcla constante durante dos horas y después de añadir furimazina a una concentración final de 20 μ M analizada como se ha descrito anteriormente. Los experimentos de desplazamiento competitivo se realizaron incubando 3 réplicas de las reacciones TNT diluidas con BIRB796 diluido en serie en presencia de un trazador BIRB-TOM a 2 mM. Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente con mezcla constante durante dos horas y después de añadir furimazina a una concentración final de 20 μ M analizada como se ha descrito anteriormente. Los resultados de los experimentos de desplazamiento competitivo en la Figura 19 indican que BIRB796 tenía la mayor afinidad por MAPK14 y Jnk2 con menor afinidad por MAPK11, MAPK13 y Jnk3. De acuerdo con los informes de la bibliografía, BIRB796 se une eficientemente a MAPK14, pero también se acopla a otros miembros de la familia MAPK y Jnk que indican los objetivos fuera de la diana para BIRB-796. Estos resultados demuestran que las coincidencias expresadas en los sistemas de expresión libres de células e identificadas en el cribado de la matriz de proteínas pueden analizarse adicionalmente mediante BRET para determinar la afinidad de unión al fármaco. Además, los resultados respaldan el uso de sistemas de expresión libres de células para generar fusiones de proteínas NanoLuc como analitos adecuados para aplicaciones de acoplamiento a la diana.

Ejemplo 18

Nivel de expresión de fusiones NanoLuc

El siguiente ejemplo demuestra que la interacción de alta afinidad con el trazador de fármacos con una señal óptima de fondo se logra cuando la expresión de la fusión NanoLuc está cerca del nivel endógeno. Como se ha descrito anteriormente, se demostró que se requería una dilución 1:1000 del ADN NanoLuc HDAC6 con un ADN portador para lograr una interacción de alta afinidad. En este ejemplo, la expresión de diluciones en serie del ADN NanoLuc HDAC6 se comparó con la expresión del HDAC6 endógeno mediante análisis de transferencia Western.

Se sembraron células HEK293 en pocillos de placas de 6 pocillos a $2,5 \times 10^5$ células/pocillo y se transfectaron con PEI con cantidades variables de ADN NanoLuc HDAC6. El ADN de NanoLuc HDAC6 se diluyó con un ADN portador que no expresa (pCI neo). La concentración final de ADN permaneció en 2 μ g/pocillo mientras que el ADN de NanoLuc HDAC6 se diluyó a 1:0, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. El control fue células no transfectadas. 24 horas después de la transfección, se retiró el medio y las células se lavaron con PBS y se lisaron durante 10 minutos con 400 μ l de tampón de lisis de mamífero (Promega) +1:50 de RQ1 ADNasa (Promega) + 1x tampón RQ1. Después de la lisis, se añadieron 133 μ l de tampón de carga SDS 4X a cada pocillo, y se recogieron los lisados celulares, se analizaron en un gel SDS-PAGE y se electro-transferieron a una membrana PVDF (Invitrogen). La membrana se bloqueó durante 1 hora con BSA al 5 % (Promega) en tampón TBS y se sondeó durante la noche a 4 °C con dilución 1:500 de anticuerpo HDAC6 (Millipore) en TBS suplementado con tween 0,1 % (TBST). Después de 3 lavados en TBST, la membrana se incubó con anticuerpo frente a HRP anti-conejo (Jackson) en TBST durante 1 hora, después se lavó 5 veces con TBST y 1 vez con TBS. A continuación, la membrana se incubó durante 1 minuto con el sustrato ECL de Promega y se escaneó en el Image Quant LAS4000 (GE). Los resultados (Figura 10) indican que la dilución de 1 1000 del ADN de NanoLuc HDAC6 tiene un nivel de expresión similar al nivel de expresión de HDAC6 endógeno. Esta es la misma dilución que proporcionó la interacción de alta afinidad con el trazador del fármaco con una señal óptima de fondo.

Ejemplo 19

Cuantificación de la unión de citocinas fluorescentes a una fusión de un receptor de superficie celular y NanoLuc

Se llevaron a cabo experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar la capacidad para medir las afinidades relativas de anticuerpos terapéuticos contra un receptor de superficie celular mediante el desplazamiento competitivo de una citocina marcada con fluorescencia. En este ejemplo, se aplicó factor de crecimiento epidérmico TAMRA disponible comercialmente (TMR-EGF; Life Technologies) en un ensayo BRET celular usando una línea celular estable que expresa una proteína de fusión NanoLuc-EGFR (Her1). La señal BRET generada entre TMR-EGF y NanoLuc-EGFR puede inhibirse tras el tratamiento con anticuerpos terapéuticos que se sabe que interfieren con la unión de EGF.

Se generó una línea celular estable HEK293 por transfección de ADN plasmídico de pF5 NanoLuc-EGFR (Promega

Corp.) y FuGene HD (Promega Corp.). Después de la transfección, la línea celular estable se generó mediante selección de G418, seguido de clonación con dilución límite. Las células derivadas clonalmente que expresan NanoLuc-EGFR se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo. 20 horas después de la siembra, el medio se reemplazó con OptiMEM sin suero y se privó a las células de suero. Después de la privación,

5 las células se trataron con TMR-EGF diluido en serie (Life Technologies). Tras el equilibrio con TMR-EGF, se añadió furimazina (un sustrato derivado de coelenterazina para NanoLuc; Promega Corp.) a una concentración de 20 μ M, y el BRET se cuantificó en un luminómetro Varioskan. En experimentos posteriores, el desplazamiento mediado por anticuerpos de TMR-EGF se midió pretratando las células con Vectibix, Erbitux o Herceptin (control negativo) antes de la estimulación con TMR-EGF (concentración final de 10 ng/ml).

10 Los resultados en la Figura 20 demuestran que el BRET puede usarse para cuantificar la unión de las citocinas fluorescentes a los receptores de la superficie celular fijados a NanoLuc. Adicionalmente, las afinidades de los anticuerpos terapéuticos capaces de inhibir la unión a las citocinas pueden medirse mediante el desplazamiento competitivo de la citocina fluorescente. Vectibix y Erbitux fueron capaces de inhibir la unión de TMR-EGF a NanoLuc-EGFR, mientras que Herceptin (un enlazador Her2 con una afinidad insignificante por Her1) fue incapaz de inhibir la unión TMR-EGF. Este ejemplo demuestra que la unión de una citocina fluorescente a una diana de alta afinidad conocida puede cuantificarse por BRET, en un formato que se puede reconfigurar fácilmente para controlar la unión de anticuerpos terapéuticos (por ejemplo, Vectibix, Erbitux, etc.) u otros enlazadores (por ejemplo, biológicos de citocinas) por desplazamiento competitivo de la citocina fluorescente. Esto demuestra la capacidad de usar BRET

15 como una técnica para medir las potencias relativas de los Fármacos biológicos en un formato celular.

Ejemplo 20

Aplicaciones de BRET

25 En algunos ejemplos, la presente divulgación permite la detección/medición de tres restos que se unen: (1) Un péptido de una proteína indicadora bioluminiscente y (2) un polipéptido de una proteína indicadora bioluminiscente que interacciona a través de la complementación estructural para formar un complejo y (3) un tercer resto fluorescente (por ejemplo, una molécula pequeña fluorescente).

30 A) Este ejemplo demuestra la transferencia de energía desde un complejo bioluminiscente formado a partir de un péptido estructuralmente complementario (SEQ ID NO:6) y un polipéptido complementario (SEQ ID NO: 7) que forman un complejo bioluminiscente. Se unió un colorante fluorescente a la secuencia peptídica complementaria. Como alternativa, podría fusionarse una proteína fluorescente (por ejemplo, una proteína de fusión) con un péptido o polipéptido (por ejemplo, creado a partir de una construcción genética).

35 Se preparó lisado clarificado de *E. coli* que expresaba la secuencia polipeptídica complementaria (poli-lisado). Se mezclaron 40 μ l del poli-lisado con 10 μ l de péptido complementario (pep) o péptido complementario marcado con fluorescencia (pep-TMR) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μ l de sustrato 100 μ M para el complejo (furimazina) en HEPES 50 mM, pH 7,4 y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La luminiscencia se midió a más de 400-700 nm en TECAN M1000.

40 La figura 21 ilustra una transferencia de energía muy eficiente desde el complejo Poli/Pep (donante) a TMR (aceptor), y el desplazamiento rojo correspondiente en la longitud de onda de la luz que se emite.

45 B) Este ejemplo demuestra el uso de BRET en la detección, tal como detectar la concentración de moléculas pequeñas o la actividad enzimática. Dado que la transferencia de energía depende en gran medida de la distancia, la magnitud de la transferencia de energía a menudo puede estar relacionada con la conformación del sistema. Por ejemplo, la inserción de un polipéptido que quela calcio puede usarse para medir la concentración de calcio a través de la modulación de la transferencia de energía.

50 Una enzima que también cambia la distancia, ya sea causando un cambio conformacional del sensor como el anterior o mediante la escisión del sensor del resto fluorescente, se puede medir a través de un sistema como se describe en el presente documento. Un miembro estructuralmente complementario de un complejo está unido a un resto fluorescente que transfiere su energía cuando interaccionan el péptido y el polipéptido estructuralmente complementarios de una proteína indicadora bioluminiscente. Un ejemplo de esto es un sensor peptídico que se ha fabricado en el que el péptido se conjuga con un colorante fluorescente a través de un enlazador (por ejemplo, sitio de escisión de DEVD Caspasa-3). Cuando se expone al polipéptido complementario, se observa transferencia de energía. Cuando se expone a Caspasa-3, el resto fluorescente se libera del complejo y se elimina la transferencia de energía, pero permanece la luminiscencia a 460 nm.

55 Un polipéptido complementario (SEQ ID NO: 8) y NL-HT (NanoLuc fusionado a HaloTag) se purificaron, se mezclaron 20 μ l de NL-HT 8pM con 20 μ l de PBI-3781 100 nM (véase, por ejemplo, el documento WO2013/078244) y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 40 μ l de NanoGlo+furimazina 100 μ M y se midió la luminiscencia sobre 300-800 nm en TECAN M1000, se mezclaron 20 μ l de 33 ng/ μ l de un polipéptido complementario (SEQ ID NO: 6) con 20 μ l de PBI-5074~500 μ M (colorante fluorescente-enlazador-péptido

complementario), se añadieron 40 µl de NanoGlo + furimazina 100 µM, y la luminiscencia se midió a más de 300-800 nm en TECAN M1000,

5 La figura 22 ilustra la transferencia de energía del complejo péptido/polipéptido complementario (donante) al colorante TOM de PBI-5074 (aceptor), y el desplazamiento rojo correspondiente en la longitud de onda de la luz que se emite.

C) Interacciones ternarias

10 La transferencia de energía con un par estructuralmente complementario de una proteína indicadora bioluminiscente también se puede utilizar para medir tres moléculas que interactúan. Un ejemplo es un GPCR fusionado a un polipéptido complementario de una proteína indicadora bioluminiscente y una proteína que interactúa con GPCR fusionada con un péptido complementario de la proteína indicadora bioluminiscente que forma un complejo bioluminiscente cuando interactúan. Esto permite medir la interacción binaria, si un ligando de GPCR de molécula pequeña con un resto fluorescente para la transferencia de energía interactúa con el complejo, se produce
15 transferencia de energía. Por consiguiente, la interacción proteína-proteína binaria y la interacción ternaria fármaco-proteína-proteína se miden en el mismo experimento. También, la molécula fluorescente solo causa una señal cuando interactúa con el par de proteínas, que elimina cualquier señal del ligando que interactúa con una proteína inactiva (figura 23).

20 Ejemplo 21

BRET con donante de múltiples componentes

25 El siguiente ejemplo demuestra que las interacciones ligando-receptor pueden controlarse a través de la transferencia de energía de un donante luminiscente de múltiples componentes, donde la emisión de luz requiere la presencia simultánea de los componentes donantes. En este ejemplo, el donante está compuesto por dos subunidades complementarias, un polipéptido 1 IS y un péptido PEP-80. El polipéptido 1 IS estaba fijado genéticamente al extremo N de BRD4, y la proteína de fusión expresada en células HEK293. La luminiscencia se generó a partir de la proteína de fusión solo en presencia tanto de furimazina () y el polipéptido complementario PEP-80 (figura 24A). Los lisados
30 celulares incubados solo con furimazina (sin péptido Pep-80) no generaron una señal significativa de donante o de receptor (figuras 24A, 25A). Cuando se aplicó una solución de ligando fluorescente BRD4 (iBET-NCT), la señal de BRET dependiente de la dosis se generó solo en presencia del péptido PEP-80 (figura 24B, 25A, 25B). Adicionalmente, esta señal de BRET podría disminuirse mediante la unión competitiva de un ligando BRD4 no fluorescente que demuestre especificidad de señal (figura 25A).

35 Las células HEK293 se transfectaron con ADN de 11S-BRD4 usando Fugene HD y se sembraron en un formato de placa de 96 pocillos. Para la transfección, el ADN de 11S-BRD4 se diluyó con ADN portador sin promotor (pGEM3Z). La concentración final de ADN/pocillo permaneció en 50 ng/pocillo; sin embargo, el ADN de 11 S-BRD4 se diluyó 1:10 (a una densidad de siembra de 20.000 células/pocillo en formato de 96 pocillos). Veinte horas después de la transfección, las células se lisaron en OptiMEM + 50 µg/ml de digitonina en presencia o ausencia de péptido PEP-80
40 1 µM. Las células se trataron después con iBET-NCT diluido en serie (PBI-4966) en presencia o ausencia de iBET 10 µM como control de especificidad. Después de 1 hora de incubación, se añadió furimazina a 10 µM y el BRET se detectó en un luminómetro Varioskan.

45 El concepto ilustrado con este ejemplo se puede aplicar para detectar la proximidad de un ligando marcado con fluorescencia a los complejos proteicos (por ejemplo, detección de la unión selectiva del ligando a receptores heterodiméricos u homodiméricos) por los miembros de unión del complejo a los componentes de un donante luminiscente de múltiples componentes. Por tanto, esta aplicación podría usarse para controlar el acoplamiento de la diana en complejos proteicos relevantes para la enfermedad.

50

Ejemplo 22

Se realizaron experimentos durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar que las interacciones receptor-ligando intracelular se pueden controlar mediante transferencia de energía desde un complejo
55 proteico, donde la emisión de luz requiere proximidad de los componentes de donante luminiscente, facilitados por la interacción entre las proteínas. En este ejemplo, el donante está compuesto por dos subunidades, un péptido 1 IS y un péptido 114. El péptido 1 IS estaba fijado genéticamente al extremo N de BRD4 y el péptido 114 estaba fijado genéticamente al extremo C de la histona H3.3. Estas proteínas de fusión se expresaron de forma simultánea en las células HEK293. Se generó luminiscencia a partir de la proteína de fusión solo en presencia de ambas construcciones de fusión (figura 26A). Las células que expresan 11 S-BRD4 solo, H3.3-114 solo o varias construcciones de control no generaron una señal significativa del donante ni del aceptor (figuras 26). Cuando se aplicó una solución de ligando fluorescente BRD4 (iBET-NCT/PBI-4966), se generó una señal del aceptor dependiente de la dosis solamente en las muestras cotransfectadas con 11S-BRD4 e Histona H3.3-114 (figura 27). Cuando se expresó como una proporción BRET (610/450), se observó BRET específica solo de un complejo facilitado de las subunidades 11S y 114 e iBET-NCT o NANOLUC-BRD4 e iBET-NCT. Adicionalmente, esta señal de BRET se disminuyó de una manera dependiente de la dosis mediante unión competitiva de un ligando de BRD4 no fluorescente (iBET 151), que demuestra
65

especificidad de señal (figura 28).

Las células HEK293 se transfectaron usando Fugene HD con construcciones de fusión de ADN de BRD4 +/- construcciones de fusión de ADN de Histona H3.3 y se sembraron en un formato de placa de 96 pocillos. Para la transfección, las construcciones indicadoras se diluyeron con ADN portador sin promotor (pGEM3Z). La concentración final de ADN/pocillo permaneció en 50 ng/pocillo; sin embargo, cada construcción de expresión de ADN se diluyó 1:10 (a una densidad de siembra de 20.000 células/pocillo en formato de 96 pocillos). Veinte horas después de la transfección, las células se trataron después con iBET-NCT diluido en serie (PBI-4966) en presencia o ausencia de iBET 151 10 μM como control de especificidad. Para determinar si iBET-151 podría competir con el trazador iBET-NCT de una manera dependiente de la dosis, las células transfectadas se trataron con iBET-151 diluido en serie en presencia de una concentración fija (2 μM) del trazador iBET-NCT/PBI-4966. Después de 1 hora de incubación, se añadió furimazina a 10 μM y el BRET se detectó en un luminómetro Varioskan.

El concepto ilustrado con este ejemplo se puede aplicar para detectar la proximidad de un ligando marcado con fluorescencia a los complejos proteicos (por ejemplo, detección de la unión selectiva del ligando a receptores heterodiméricos u homodiméricos) por los miembros de unión del complejo a los componentes de un donante luminiscente de múltiples componentes. Esta aplicación podría usarse para controlar el acoplamiento de la diana en complejos proteicos. Además, esta técnica podría permitir la identificación o caracterización de compuestos selectivos de complejos proteicos intracelulares relevantes para la enfermedad.

Ejemplo 23

Los experimentos se realizaron durante el desarrollo de realizaciones de la presente invención para demostrar la capacidad para perfilar la selectividad y afinidad intracelular de un fármaco contra un panel de supuestas dianas dentro de una familia de dianas filogenéticas determinadas usando BRET. En este ejemplo, se perfila el acoplamiento de vorinostat (SAHA) en la totalidad del panel de HDAC de clase I/II/IV (no-sirtuína) en el interior de las células. En primer lugar, el derivado de SAHA fluorescente (SAHA-NCT) se perfila frente a varias fusiones de NANOLUC/HDAC usando BRET. Una vez confirmada la transferencia de energía entre las fusiones de NANOLUC/HDAC individuales y el trazador SAHA, la afinidad de SAHA se determina mediante alteración competitiva de cada complejo de transferencia de energía. Por tanto, las afinidades se pueden deducir mediante el valor de la CI_{50} generada en cada experimento. Adicionalmente, las afinidades de los inhibidores por los dominios individuales se pueden determinar mediante la fusión genética de NANOLUC al dominio segregado de la proteína diana.

Determinación de las afinidades del trazador SAHA por las HDAC en el interior de las células. Las células HeLa se transfectaron con ADN plasmídico que codifica fusiones NANOLUC con la totalidad de la familia de histonas desacetilasas no sirtuína (HDAC 1-11). Las células se transfectaron diluyendo cada construcción de ADN a una relación en masa de 1:100 en ADN portador de pGEM3Z y formando complejos de ADN-lípido usando Fugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN de 3:1. A continuación, las células transfectadas se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 20.000 células por pocillo (rendimiento total de 50 ng/pocillo de ADN). Veinticuatro horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-4968 diluido en serie en presencia o ausencia de SAHA a 20 μM (las últimas muestras usadas para cuantificar BRET no específico). Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 10 μM . A continuación, se midió el BRET en un luminómetro BMG Clariostar equipado con filtros de paso de banda de 450 nm y paso largo de 610 nm. La proporción BRET se determinó dividiendo la señal en el canal 630 por la señal en el canal 450. Para determinar los valores BRET específicos corregidos por el fondo, los valores de BRET no específicos a cada concentración del trazador se restaron de los valores de BRET con el trazador solo.

Ejemplo 24

El ejemplo siguiente sirve para demostrar la capacidad para medir la unión de un compuesto a una diana intracelular con resolución celular simple usando imágenes BRET. Este ejemplo muestra la unión de SAHA y su derivado fluorescente, SAHA-NCT (PBI-4968) a NanoLuc-HDAC6 y HDAC10-NanoLuc en células vivas.

Medición de la unión de SAHA y SAHA-NCT a HDAC6 y HDAC10 en células vivas mediante imágenes BRET. Las células HeLa se transfectaron con ADN plasmídico que codifica fusiones de NanoLuc con HDAC6 y HDAC10, respectivamente. Las células se transfectaron diluyendo cada construcción de ADN a una relación en masa de 1:100 en ADN portador de pGEM3Z y formando complejos de ADN-lípido añadiendo Fugene HD (Promega Corporation) a una proporción de lípido:ADN de 3:1. El complejo de transfección se mezcló con una suspensión celular (1e5 células por ml), seguido de siembra en placas de fondo de cristal de 35 mm a una densidad de 200.000 células por placa (rendimiento total de 50 ng/pocillo de ADN). Veinticuatro horas después de la transfección, el medio celular se reemplazó con medio sin suero (Opti-MEM) y se incubó con PBI-4968 2 mM en presencia o ausencia de SAHA a 10 mM. Las células se incubaron a 37 °C durante dos horas. A las muestras que expresan NanoLuc, se añadió furimazina a una concentración final de 10 μM . Se tomaron imágenes de las muestras usando un microscopio bioluminiscente Olympus LV200. Para medir la unión y el desplazamiento de PBI-4968 a NanoLuc-HDAC6 o HDAC10-NanoLuc por BRET, se adquirieron imágenes secuenciales utilizando un filtro de paso corto de 495 y un filtro de paso largo de 590

nm, respectivamente (figura 34 y 35). Las secciones de imagen que representan células individuales se analizaron cuantitativamente usando el programa de análisis de imagen ImageJ. La proporción BRET se determinó dividiendo el valor obtenido para el canal 590 por el valor del canal 450. Se analizó un mínimo de 100 células individuales para cada muestra. Todos los datos se resumen en un formato de gráfico de puntos (figura 36). La unión específica de SAHA y SAHA-NCT se demostró mediante análisis comparativo de los valores de BRET obtenidos de tres muestras diferentes:

Muestra 1 - control negativo (sin tratar),

Muestra 2 - control positivo (PBI-4968 2 mM),

Muestra 3 - desplazamiento del trazador (PBI-4968 2 mM + SAHA 10 mM)

Los resultados demuestran la captación celular y la unión específica de PBI-4968 y de SAHA a diferentes miembros de la familia de HDAC (HDAC6 y 10) en un solo nivel celular. Los resultados sugieren que el grado de captación y/o unión varía considerablemente en una población celular. El formato de ensayo BRET basado en imágenes permite el análisis de la unión del compuesto específico diana en un solo nivel celular para determinar las diferencias en función del tipo de célula, la densidad celular, el estado del ciclo celular y otros parámetros fisiológicos que requieren resolución de una sola célula para su análisis.

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe considerarse limitada indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que serán evidentes para los expertos en los campos relevantes entren dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Hitko, Carolyn W.
Kirkland, Thomas
Machleidt, Thomas
Ohana, Rachel Friedman
Robers, Matt
Wood, Keith

<120> Reconocimiento de la unión a diana celular por un agente bioactivo utilizando transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia intracelular

<130> PRMG-33031/US-3/PRO

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 169
<212> PRT
<213> *Oplophorus gracilirostris*

<400> 1

021

ES 2 803 503 T3

Phe Thr Leu Ala Asp Phe Val Gly Asp Trp Gln Gln Thr Ala Gly Tyr
 1 5 10 15

Asn Gln Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Leu Ser Ser Leu Phe Gln
 20 25 30

Ala Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Lys Val Val Leu Ser Gly
 35 40 45

Glu Asn Gly Leu Lys Ala Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr Glu Gly
 50 55 60

Leu Ser Gly Phe Gln Met Gly Leu Ile Glu Met Ile Phe Lys Val Val
 65 70 75 80

Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Ile Ile Leu His Tyr Gly Thr
 85 90 95

Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe Gly Arg
 100 105 110

Pro Tyr Pro Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Gln Ile Thr Val Thr
 115 120 125

Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Tyr Asp Glu Arg Leu Ile Asn
 130 135 140

Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val Thr Gly
 145 150 155 160

Trp Arg Leu Cys Glu Asn Ile Leu Ala
 165

5 <210> 2
 <211> 513
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintético

<400> 2

ES 2 803 503 T3

atggtgttta ccttggcaga tttcgttga gactggcaac agacagctgg atacaaccaa 60
gatcaagtgt tagaacaagg aggattgtct agtctgttcc aagccctggg agtgtcagtc 120
acccaatcc agaaagttgt gctgtctggg gagaatgggt taaaagctga tattcatgct 180
atcatccctt acgagggact cagtggtttt caaatgggtc tgattgaaat gatcttcaaa 240
gttgtttacc cagtggatga tcatcatttc aagattattc tccattatgg taccactcgtt 300
attgacggtg tgacaccaaa catgattgac tactttggac gcccttacc tggaattgct 360
gtgtttgacg gcaagcagat cacagttact ggaactctgt ggaacggcaa caagatctat 420
gatgagcgcc tgatcaacc agatggttca ctctcttcc gcgttactat caatggagtc 480
accggatggc gcctttgcga gaacattctt gcc 513

<210> 3
<211> 8414
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintético

<400> 3

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240
gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360
ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga 420
cggtaaattgg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg 480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggt atgcggtttt ggcagtacac 540
caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600

ES 2 803 503 T3

caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaataaacc 660
 cgccccgttg acgcaaattg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720
 tggtttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcg gtagtttatc acagttaaat 780
 tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca gaagttggtc 840
 gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggc tacaagacag gtttaaggag accaatagaa 900
 actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta ttggtcttac 960
 tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt acagctctta 1020
 aggctagagt attaatacga ctactatag ggctagcgcct caccatggtc ttcacactcg 1080
 aagatttcgt tggggactgg cgacagacag cgggctacaa cctggaccaa gtccttgaac 1140
 agggaggtgt gtccagtttg tttcagaatc tcgggggtgc cgtaactccg atccaaagga 1200
 ttgtcctgag cggtgaaaat gggctgaaga tcgacatcca tgtcatcatc ccgatgaag 1260
 gtctgagcgg cgaccaaattg ggccagatcg aaaaaatttt taaggtggtg taccctgtgg 1320
 atgatcatca ctttaaggtg atcctgcact atggcacact ggtaatcgac ggggttacgc 1380
 cgaacatgat cgactatttc ggacggccgt atgaaggcat cgccgtgttc gacggcaaaa 1440
 agatcactgt aacagggacc ctgtggaacg gcaacaaaat tatcgacgag cgcctgatca 1500
 accccgacgg ctccctgctg ttccgagtaa ccatcaacgg agtgaccggc tggcggctgt 1560
 gcgaacgcat tctggcgggc tcgagcggcg cgatcgccat gacctcaacc ggccaggatt 1620
 ccaccacaac caggcagcga agaagtaggc agaaccacca gtcgccccct caggactcca 1680
 gtgtcacttc gaagcgaat attaaaaagg gagccgttcc ccgctctatc cccaatctag 1740
 cggaggtaaa gaagaaaggc aaaatgaaga agctcggcca agcaatggaa gaagacctaa 1800
 tcgtgggact gcaagggatg gatctgaacc ttgaggctga agcactggct ggactggct 1860
 tgggtgttga tgagcagtta aatgaattcc attgcctctg ggatgacagc ttcccgaag 1920
 gccctgagcg gctccatgcc atcaaggagc aactgatcca ggagggcctc ctagatcgct 1980
 gcgtgtcctt tcaggcccgg tttgctgaaa aggaagagct gatgttggtt cacagcctag 2040
 aatatattga tctgatggaa acaaccagc acatgaatga gggagaactc cgtgtcctag 2100
 cagacaccta cgactcagtt tatctgcatc cgaactcata ctctgtgcc tgcttgccct 2160
 caggctctgt cctcaggctg gtggatgcgg tcctgggggc tgagatccgg aatggcatgg 2220
 ccatcattag gcctcctgga catcacgcc agcacagtct tatggatggc tattgcatgt 2280
 tcaaccacgt ggctgtggca gcccgctatg ctcaacagaa acaccgcatc cggagggctc 2340
 ttatcgtaga ttgggatgtg caccacggtc aaggaacaca gttcaccttc gaccaggacc 2400
 ccagtgtcct ctatttctcc atccaccgct acgagcaggg taggttctgg ccccacctga 2460
 aggcctctaa ctggtcacc acaggtttcg gccaaaggcca aggatatacc atcaatgtgc 2520

ES 2 803 503 T3

cttggaacca ggtggggatg cgggatgctg actacattgc tgctttcctg cacgtcctgc 2580
 tgccagtcgc cctcgagttc cagcctcagc tggcctcctg ggctgctgga tttgatgccc 2640
 tgcaagggga cccaaggggt gagatggccg cactccggc agggttcgcc cagctaacc 2700
 acctgctcat gggctctggca ggaggcaagc tgatcctgtc tctggagggt ggctacaacc 2760
 tccgcgcctt ggctgaaggc gtcagtgtt cgctccacac cttctggga gacccttgcc 2820
 ccatgctgga gtcacctggt gcccctgcc ggagtgccca ggcttcagtt tctgtgctc 2880
 tgaagccct tgagccctc tgggaggtt ttgtgagatc aactgagacc gtggagaggg 2940
 acaacatgga ggaggacaat gtagaggaga gcgaggagga aggaccctgg gagccccctg 3000
 tgctcccaat cctgacatgg ccagtgtac agtctcgac agggctggtc tatgaccaa 3060
 atatgatgaa tcaactgcaac ttgtgggaca gccaccacc tgaggtaacc cagcgcactc 3120
 tgccgatcat gtccgtctg gaggagctg gccttgccgg gcgtgctc acctgacac 3180
 cgcgcctgc cacagaggct gagctgtca cctgtcacag tgctgagtac gtgggtcatc 3240
 tccgggccac agagaaaatg aaaaccggg agctgcaccg tgagagttcc aactttgact 3300
 ccatctatat ctgccccagt accttcgct gtgcacagct tgccactggc gctgcctgcc 3360
 gcctgggtgga ggctgtgctc tcaggagagg ttctgaatgg tgctgctgtg gtgcgtcccc 3420
 caggacacca cgcagagcag gatgcagctt gcggttttg cttttcaac tctgtggctg 3480
 tggctgctcg ccatgccag actatcagtg gcatgccct acggatcctg attgtggatt 3540
 gggatgtcca ccacggtaat ggaactcagc acatgtttga ggatgacccc agtgtgctat 3600
 atgtgtccct gcaccgctat gatcatggca cttcttccc catgggggat gagggtgcca 3660
 gcagccagat cggccgggct gcgggcacag gcttcaccgt caacgtggca tggaacgggc 3720
 cccgcatggg tgatgctgac tacctagctg cctggcatcg cctggtgctt cccattgct 3780
 acgagtttaa ccagaactg gtgctggtct cagctggctt tgatgctgca cggggggatc 3840
 cgctgggggg ctgccaggtg tcacctgagg gttatgcca cctcaccac ctgctgatgg 3900
 gccttgccag tggccgcat atccttatcc tagagggtgg ctataacctg acatccactc 3960
 cagagtccat ggctgcctgc actcgtccc tcttgagaga cccaccacc ctgctgacc 4020
 tgccacggcc cccactatca gggccctgg cctcaatcac tgagaccatc caagtccatc 4080
 gcagatactg gcgagctta cgggtcatga aggtagaaga cagagaagga ccctccagtt 4140
 ctaagttggt caccaagaag gcacccaac cagccaaacc taggttagct gagcggatga 4200
 ccacacgaga aaagaaggt ctggaagcag gcatggggaa agtcacctcg gcatcatttg 4260
 ggaagagtc cactccaggc cagactaact cagagacagc tgtggtggcc ctcactcagg 4320
 accagccctc agaggcagcc acagggggag cactctggc ccagaccatt tctgaggcag 4380

ES 2 803 503 T3

ccattggggg agccatgctg ggccagacca cctcagagga ggctgtcggg ggagccactc 4440
 cggaccagac cacctcagag gagactgtgg gaggagccat tctggaccag accacctcag 4500
 aggatgctgt tgggggagcc acgctgggcc agactacctc agaggaggct gtaggaggag 4560
 ctacactggc ccagaccacc tcggaggcag ccatggaggg agccacactg gaccagacta 4620
 cgtcagagga ggctccaggg ggcaccgagc tgatccaaac tcctctagcc tcgagcacag 4680
 accaccagac ccccccaacc tcacctgtgc agggaactac accccagata tctcccagta 4740
 cactgattgg gagtctcagg accttggagc taggcagcga atctcagggg gcctcagaat 4800
 ctcaggcccc aggagaggag aacctactag gagaggcagc tggagggtcag gacatggctg 4860
 attcgatgct gatgcagga tctaggggcc tctactgatca ggccatattt tatgctgtga 4920
 caccactgcc ctggtgtccc catttgggtg cagtatgccc catacctgca gcaggcctag 4980
 acgtgaccca accttgtggg gactgtggaa caatccaaga gaattgggtg tgtctctctt 5040
 gctatcaggt ctactgtggt cgttacatca atggccacat gctccaacac catggaaatt 5100
 ctggacaccc gctggtcctc agctacatcg acctgtcagc ctggtgttac tactgtcagg 5160
 cctatgtcca ccaccaggct ctctagatg tgaagaacat cggccaccag aacaagtttg 5220
 gggaggatat gccccacca cacgtttaa cgaattcggg ctcggtacc ggggatcctc 5280
 tagagtcgac ctgcaggcat gcaagctgat ccggctgcta acaaagcccg aaaggaagct 5340
 gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttggggc ggccgcttcg 5400
 agcagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa 5460
 aaaatgcttt atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg 5520
 caataaacia gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggagat 5580
 gtgggaggtt tttttaagca agtaaacct ctacaaatgt ggtaaaatcg aattttaaca 5640
 aaatattaac gcttacaatt tcctgatgcg gtattttctc cttacgcac tgtgcggtat 5700
 ttcacaccgc atacgaggat ctgvcagca ccatggcctg aaataacctc tgaagagga 5760
 acttggtag gtaccttctg aggcggaaag aaccagctgt ggaatgtgtg tcagttaggg 5820
 tgtggaaagt cccagggctc cccagcaggc agaagtatgc aaagcatgca tctcaattag 5880
 tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat gcaagcatg 5940
 catctcaatt agtcagcaac catagtccc cccctaactc cgccatccc gccctaact 6000
 ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccct ggctgactaa tttttttat ttatgcagag 6060
 gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc 6120
 ctaggctttt gcaaaaagct taattaactg ttgacaatta atcatcggca tagtatatcg 6180
 gcatagtata atacgacaag gtgaggaact aaaccagga ggcagatcat gattgaacia 6240
 gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg ctatgactgg 6300

ES 2 803 503 T3

gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc gcaggggagc 6360
ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca 6420
gcgcggtat cgtggctggc cagcagggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgct 6480
actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcaagtgc cggggcagga tctcctgtca 6540
tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat 6600
acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca 6660
cgtactcggg tggaagccgg tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg 6720
ctcgcgccag ccgaactggt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcgg cgaggatctc 6780
gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct 6840
ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct 6900
acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac 6960
ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcata gccttctatc gccttcttga cgagttcttc 7020
tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgcg gcccaacctg ccatcacgat 7080
ggccgcaata aaatatcttt attttcatta catctgtgtg ttggtttttt gtgtgaatcg 7140
atagcgataa ggatcctctt tgcgcttgcg ttttcccttg tccagatagc ccagtagctg 7200
acattcatcc ggggtcagca ccgtttctgc ggactggctt tctaccgggt atcagctcac 7260
tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga 7320
gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat 7380
aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcaagc gtggcgaaac 7440
ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct 7500
gttccgacct tgccgcttac cggataacct tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg 7560
ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg ctccaagctg 7620
ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt 7680
cttgagtcca acccggtgta acacgactta tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg 7740
attagcagag cgaggtatgt aggcgggtgct acagagttct tgaagtgggt gcctaactac 7800
ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga 7860
aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt 7920
gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatttc aagaagatcc tttgatcttt 7980
tctacggggg ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgct aagggatttt ggtcatgaga 8040
ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttatagtccg gaaatacagg aacgcacgct 8100
ggatggccct tcgctgggat ggtgaaacca tgaaaaatgg cagcttcagt ggattaagtg 8160

ES 2 803 503 T3

ggggtaatgt ggcctgtacc ctctggttgc ataggtattc atacggttaa aatttatcag 8220
 gcgcgattgc ggcagttttt cgggtggttt gttgccattt ttacctgtct gctgccgtga 8280
 tcgcgctgaa cgcgtttttag cgggtgcgtac aattaagggga ttatggtaaa tccacttact 8340
 gtctgccctc gtagccatcg agataaaccg cagtactccg gccacgatgc gtccggcgta 8400
 gaggatcgag atct 8414

<210> 4
 <211> 4185
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintético

10

<400> 4

atggtcttca cactcgaaga tttcgttggg gactggcgac agacagccgg ctacaacctg 60
 gaccaagtcc ttgaacaggg aggtgtgtcc agtttgtttc agaatctcgg ggtgtccgta 120
 actccgatcc aaaggattgt cctgagcggg gaaaatgggc tgaagatcga catccatgtc 180
 atcatcccgt atgaaggtct gagcggcgac caaatgggcc agatcgaaaa aatttttaag 240
 gtggtgtacc ctgtggatga tcatcacttt aaggtgatcc tgcactatgg cactctggta 300
 atcgacgggg ttacgccgaa catgatcgac tatttcggac ggccgtatga aggcatcgcc 360
 gtgttcgacg gcaaaaagat cactgtaaca gggaccctgt ggaacggcaa caaaattatc 420
 gacgagcgcc tgatcaacc cgcggtctcc ctgctgttcc gagtaaccat caacggagtg 480
 accggctggc ggctgtgca acgcattctg gcgggctcga gcggcgcgat cgccatgacc 540
 tcaaccggcc aggattccac cacaaccagg cagcgaagaa gtaggcagaa ccccagtcg 600
 ccccctcagg actccagtgt cacttcgaag cgaaatatta aaaagggagc cgttccccgc 660
 tctatcccca atctagcggg ggtaaagaag aaaggcaaaa tgaagaagct cggccaagca 720
 atggaagaag acctaactgt gggactgcaa gggatggatc tgaaccttga ggctgaagca 780
 ctggctggca ctggcttggg gttggatgag cagttaaag aattccattg cctctgggat 840
 gacagcttcc cggaaggccc tgagcggctc catgccatca aggagcaact gatccaggag 900
 ggctcctag atcgtcgcgt gtcctttcag gcccggttg ctgaaaagga agagctgatg 960
 ttggttcaca gcctagaata tattgatctg atggaaacaa cccagtacat gaatgagga 1020
 gaactccgtg tcctagcaga cacctacgac tcagtttatc tgcattccgaa ctcatactcc 1080
 tgtgcctgcc tggcctcagg ctctgtcctc aggetggtgg atgcggtcct gggggctgag 1140
 atccggaatg gcatggccat cattaggcct cctggacatc acgcccagca cagtcttatg 1200
 gatggctatt gcatgttcaa ccacgtggct gtggcagccc gctatgctca acagaaacac 1260
 cgcattccgga gggtccttat cgtagattgg gatgtgcacc acggtcaagg aacacagttc 1320

ES 2 803 503 T3

acctcgacc aggaccccag tgtcctctat ttctccatcc accgctacga gcagggtagg 1380
 ttctggcccc acctgaaggc ctctaactgg tccaccacag gtttcggcca aggccaagga 1440
 tataccatca atgtgccttg gaaccagggtg gggatgcggg atgctgacta cattgctgct 1500
 ttctgacagc tcctgctgcc agtcgccctc gagttccagc ctgagctggt cctgggtggct 1560
 gctggatttg atgccctgca aggggacccc aagggtgaga tggccgccac tccggcaggg 1620
 ttgcccagc taaccacact gctcatgggt ctggcaggag gcaagctgat cctgtctctg 1680
 gaggtggct acaacctccg cgccctggct gaaggcgtca gtgcttcgct ccacaccctt 1740
 ctgggagacc ctgccccat gctggagtca cctggtgccc cctgccggag tgcccaggct 1800
 tcagtttct gtgctctgga agcccttgag cccttctggg aggttcttgt gagatcaact 1860
 gagaccgtgg agagggaaa catggaggag gacaatgtag aggagagcga ggaggaagga 1920
 ccctgggagc cccctgtgct cccaatcctg acatggccag tgctacagtc tcgcacaggg 1980
 ctggtctatg accaaaatat gatgaatcac tgcaacttgt gggacagcca ccaccctgag 2040
 gtaccccagc gcatcttgcg gatcatgtgc cgtctggagg agctgggcct tgccggggcgc 2100
 tgccctaccc tgacaccgcg ccctgccaca gaggtgagc tgctcacctg tcacagtgct 2160
 gagtacgtgg gtcactctccg ggccacagag aaaatgaaaa cccgggagct gcaccgtgag 2220
 agttccaact ttgactccat ctatatctgc cccagtacct tcgcctgtgc acagcttgcc 2280
 actggcgctg cctgccgcct ggtggaggct gtgctctcag gagaggttct gaatggtgct 2340
 gctgtggtgc gtccccagg acaccacgca gagcaggatg cagcttgccgg tttttgcttt 2400
 ttcaactctg tggctgtggc tgctcgccat gccagacta tcagtgggca tgccctacgg 2460
 atcctgattg tggattggga tgtccaccac ggtaatggaa ctgagcacat gtttgaggat 2520
 gaccccagtg tgctatatgt gtccctgcac cgctatgatc atggcacctt cttccccatg 2580
 ggggatgagg gtgccagcag ccagatcggc cgggctgcgg gcacaggctt caccgtcaac 2640
 gtggcatgga acgggccccg catgggtgat gctgactacc tagctgcctg gcatgcctg 2700
 gtgcttcca ttgcctacga gtttaacca gaactggtgc tggctcagc tggctttgat 2760
 gctgcacggg gggatccgct ggggggctgc cagggtgtcac ctgaggggta tgcccacctc 2820
 acccacctgc tgatgggcct tgccagtggc cgcttatcc ttatcctaga ggggtggctat 2880
 aacctgacat ccatctcaga gtccatggct gcctgactc gctccctcct tggagacca 2940
 ccaccctgc tgaccctgcc acggccccca ctatcagggg ccctggcctc aatcactgag 3000
 accatccaag tccatcgagc atactggcgc agcttacggg tcatgaaggc agaagacaga 3060
 gaaggaccct ccagttctaa gttggtcacc aagaaggcac cccaaccagc caaacctagg 3120
 ttagctgagc ggatgaccac acgagaaaag aaggttctgg aagcaggcat ggggaaagtc 3180

ES 2 803 503 T3

acctcggcat catttgggga agagtccact ccaggccaga ctaactcaga gacagctgtg 3240
 gtggccctca ctcaggacca gccctcagag gcagccacag ggggagccac tctggcccag 3300
 accatttctg aggagccat tgggggagcc atgctgggcc agaccacctc agaggaggct 3360
 gtcgggggag ccaactccgga ccagaccacc tcagaggaga ctgtgggagg agccattctg 3420
 gaccagacca cctcagagga tgctgttggg ggagccacgc tgggccagac tacctcagag 3480
 gaggctgtag gaggagctac actggcccag accacctcgg aggcagccat ggagggagcc 3540
 aactggacc agactacgtc agaggaggct ccagggggca ccgagctgat ccaaactcct 3600
 ctagcctcga gcacagacca ccagaccccc ccaacctcac ctgtgcaggg aactacacc 3660
 cagatatctc ccagtacact gattgggagt ctcaggacct tggagctagg cagcgaatct 3720
 cagggggcct cagaatctca ggccccagga gaggagaacc tactaggaga ggcagctgga 3780
 ggtcaggaca tggctgattc gatgctgatg cagggatcta ggggcctcac tgatcaggcc 3840
 atattttatg ctgtgacacc actgccctgg tgtccccatt tgggtggcagt atgcccata 3900
 cctgcagcag gcctagacgt gaccacacct tgtggggact gtggaacaat ccaagagaat 3960
 tgggtgtgtc tctcttgcta tcaggtctac tgtggtcggt acatcaatgg ccacatgctc 4020
 caacaccatg gaaattctgg acaccgctg gtcctcagct acatcgacct gtcagcctgg 4080
 tgttactact gtcaggccta tgtccaccac caggctctcc tagatgtgaa gaacatcgcc 4140
 caccagaaca agtttgggga ggatatgccc caccacacag tttaa 4185

<210> 5
 <211> 1394
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 5

Met Val Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala
 1 5 10 15
 Gly Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu
 20 25 30
 Phe Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu
 35 40 45
 Ser Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr
 50 55 60
 Glu Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys
 65 70 75 80

ES 2 803 503 T3

Val Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr
85 90 95

Gly Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe
100 105 110

Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr
115 120 125

Val Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu
130 135 140

Ile Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val
145 150 155 160

Thr Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala Gly Ser Ser Gly Ala
165 170 175

Ile Ala Met Thr Ser Thr Gly Gln Asp Ser Thr Thr Thr Arg Gln Arg
180 185 190

Arg Ser Arg Gln Asn Pro Gln Ser Pro Pro Gln Asp Ser Ser Val Thr
195 200 205

Ser Lys Arg Asn Ile Lys Lys Gly Ala Val Pro Arg Ser Ile Pro Asn
210 215 220

Leu Ala Glu Val Lys Lys Lys Gly Lys Met Lys Lys Leu Gly Gln Ala
225 230 235 240

Met Glu Glu Asp Leu Ile Val Gly Leu Gln Gly Met Asp Leu Asn Leu
245 250 255

Glu Ala Glu Ala Leu Ala Gly Thr Gly Leu Val Leu Asp Glu Gln Leu
260 265 270

Asn Glu Phe His Cys Leu Trp Asp Asp Ser Phe Pro Glu Gly Pro Glu
275 280 285

Arg Leu His Ala Ile Lys Glu Gln Leu Ile Gln Glu Gly Leu Leu Asp
290 295 300

Arg Cys Val Ser Phe Gln Ala Arg Phe Ala Glu Lys Glu Glu Leu Met
305 310 315 320

Leu Val His Ser Leu Glu Tyr Ile Asp Leu Met Glu Thr Thr Gln Tyr

ES 2 803 503 T3

				325						330					335
Met	Asn	Glu	Gly	Glu	Leu	Arg	Val	Leu	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val
			340					345					350		
Tyr	Leu	His	Pro	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ala	Cys	Leu	Ala	Ser	Gly	Ser
		355					360					365			
Val	Leu	Arg	Leu	Val	Asp	Ala	Val	Leu	Gly	Ala	Glu	Ile	Arg	Asn	Gly
	370					375					380				
Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Pro	Pro	Gly	His	His	Ala	Gln	His	Ser	Leu	Met
385					390					395					400
Asp	Gly	Tyr	Cys	Met	Phe	Asn	His	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Arg	Tyr	Ala
				405					410					415	
Gln	Gln	Lys	His	Arg	Ile	Arg	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Asp	Trp	Asp	Val
			420					425					430		
His	His	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Phe	Thr	Phe	Asp	Gln	Asp	Pro	Ser	Val
		435					440					445			
Leu	Tyr	Phe	Ser	Ile	His	Arg	Tyr	Glu	Gln	Gly	Arg	Phe	Trp	Pro	His
	450					455					460				
Leu	Lys	Ala	Ser	Asn	Trp	Ser	Thr	Thr	Gly	Phe	Gly	Gln	Gly	Gln	Gly
465					470					475					480
Tyr	Thr	Ile	Asn	Val	Pro	Trp	Asn	Gln	Val	Gly	Met	Arg	Asp	Ala	Asp
				485					490						495
Tyr	Ile	Ala	Ala	Phe	Leu	His	Val	Leu	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Glu	Phe
			500					505					510		
Gln	Pro	Gln	Leu	Val	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Phe	Asp	Ala	Leu	Gln	Gly
		515					520					525			
Asp	Pro	Lys	Gly	Glu	Met	Ala	Ala	Thr	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Gln	Leu
	530					535					540				
Thr	His	Leu	Leu	Met	Gly	Leu	Ala	Gly	Gly	Lys	Leu	Ile	Leu	Ser	Leu
545					550					555					560
Glu	Gly	Gly	Tyr	Asn	Leu	Arg	Ala	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Ser	Ala	Ser
				565					570						575

ES 2 803 503 T3

Leu His Thr Leu Leu Gly Asp Pro Cys Pro Met Leu Glu Ser Pro Gly
 580 585 590

Ala Pro Cys Arg Ser Ala Gln Ala Ser Val Ser Cys Ala Leu Glu Ala
 595 600 605

Leu Glu Pro Phe Trp Glu Val Leu Val Arg Ser Thr Glu Thr Val Glu
 610 615 620

Arg Asp Asn Met Glu Glu Asp Asn Val Glu Glu Ser Glu Glu Glu Gly
 625 630 635 640

Pro Trp Glu Pro Pro Val Leu Pro Ile Leu Thr Trp Pro Val Leu Gln
 645 650 655

Ser Arg Thr Gly Leu Val Tyr Asp Gln Asn Met Met Asn His Cys Asn
 660 665 670

Leu Trp Asp Ser His His Pro Glu Val Pro Gln Arg Ile Leu Arg Ile
 675 680 685

Met Cys Arg Leu Glu Glu Leu Gly Leu Ala Gly Arg Cys Leu Thr Leu
 690 695 700

Thr Pro Arg Pro Ala Thr Glu Ala Glu Leu Leu Thr Cys His Ser Ala
 705 710 715 720

Glu Tyr Val Gly His Leu Arg Ala Thr Glu Lys Met Lys Thr Arg Glu
 725 730 735

Leu His Arg Glu Ser Ser Asn Phe Asp Ser Ile Tyr Ile Cys Pro Ser
 740 745 750

Thr Phe Ala Cys Ala Gln Leu Ala Thr Gly Ala Ala Cys Arg Leu Val
 755 760 765

Glu Ala Val Leu Ser Gly Glu Val Leu Asn Gly Ala Ala Val Val Arg
 770 775 780

Pro Pro Gly His His Ala Glu Gln Asp Ala Ala Cys Gly Phe Cys Phe
 785 790 795 800

Phe Asn Ser Val Ala Val Ala Ala Arg His Ala Gln Thr Ile Ser Gly
 805 810 815

His Ala Leu Arg Ile Leu Ile Val Asp Trp Asp Val His His Gly Asn
 820 825 830

ES 2 803 503 T3

Gly Thr Gln His Met Phe Glu Asp Asp Pro Ser Val Leu Tyr Val Ser
835 840 845

Leu His Arg Tyr Asp His Gly Thr Phe Phe Pro Met Gly Asp Glu Gly
850 855 860

Ala Ser Ser Gln Ile Gly Arg Ala Ala Gly Thr Gly Phe Thr Val Asn
865 870 875 880

Val Ala Trp Asn Gly Pro Arg Met Gly Asp Ala Asp Tyr Leu Ala Ala
885 890 895

Trp His Arg Leu Val Leu Pro Ile Ala Tyr Glu Phe Asn Pro Glu Leu
900 905 910

Val Leu Val Ser Ala Gly Phe Asp Ala Ala Arg Gly Asp Pro Leu Gly
915 920 925

Gly Cys Gln Val Ser Pro Glu Gly Tyr Ala His Leu Thr His Leu Leu
930 935 940

Met Gly Leu Ala Ser Gly Arg Ile Ile Leu Ile Leu Glu Gly Gly Tyr
945 950 955 960

Asn Leu Thr Ser Ile Ser Glu Ser Met Ala Ala Cys Thr Arg Ser Leu
965 970 975

Leu Gly Asp Pro Pro Pro Leu Leu Thr Leu Pro Arg Pro Pro Leu Ser
980 985 990

Gly Ala Leu Ala Ser Ile Thr Glu Thr Ile Gln Val His Arg Arg Tyr
995 1000 1005

Trp Arg Ser Leu Arg Val Met Lys Val Glu Asp Arg Glu Gly Pro
1010 1015 1020

Ser Ser Ser Lys Leu Val Thr Lys Lys Ala Pro Gln Pro Ala Lys
1025 1030 1035

Pro Arg Leu Ala Glu Arg Met Thr Thr Arg Glu Lys Lys Val Leu
1040 1045 1050

Glu Ala Gly Met Gly Lys Val Thr Ser Ala Ser Phe Gly Glu Glu
1055 1060 1065

Ser Thr Pro Gly Gln Thr Asn Ser Glu Thr Ala Val Val Ala Leu
1070 1075 1080

ES 2 803 503 T3

Thr Gln Asp Gln Pro Ser Glu Ala Ala Thr Gly Gly Ala Thr Leu
1085 1090 1095

Ala Gln Thr Ile Ser Glu Ala Ala Ile Gly Gly Ala Met Leu Gly
1100 1105 1110

Gln Thr Thr Ser Glu Glu Ala Val Gly Gly Ala Thr Pro Asp Gln
1115 1120 1125

Thr Thr Ser Glu Glu Thr Val Gly Gly Ala Ile Leu Asp Gln Thr
1130 1135 1140

Thr Ser Glu Asp Ala Val Gly Gly Ala Thr Leu Gly Gln Thr Thr
1145 1150 1155

Ser Glu Glu Ala Val Gly Gly Ala Thr Leu Ala Gln Thr Thr Ser
1160 1165 1170

Glu Ala Ala Met Glu Gly Ala Thr Leu Asp Gln Thr Thr Ser Glu
1175 1180 1185

Glu Ala Pro Gly Gly Thr Glu Leu Ile Gln Thr Pro Leu Ala Ser
1190 1195 1200

Ser Thr Asp His Gln Thr Pro Pro Thr Ser Pro Val Gln Gly Thr
1205 1210 1215

Thr Pro Gln Ile Ser Pro Ser Thr Leu Ile Gly Ser Leu Arg Thr
1220 1225 1230

Leu Glu Leu Gly Ser Glu Ser Gln Gly Ala Ser Glu Ser Gln Ala
1235 1240 1245

Pro Gly Glu Glu Asn Leu Leu Gly Glu Ala Ala Gly Gly Gln Asp
1250 1255 1260

Met Ala Asp Ser Met Leu Met Gln Gly Ser Arg Gly Leu Thr Asp
1265 1270 1275

Gln Ala Ile Phe Tyr Ala Val Thr Pro Leu Pro Trp Cys Pro His
1280 1285 1290

Leu Val Ala Val Cys Pro Ile Pro Ala Ala Gly Leu Asp Val Thr
1295 1300 1305

Gln Pro Cys Gly Asp Cys Gly Thr Ile Gln Glu Asn Trp Val Cys

ES 2 803 503 T3

1310 1315 1320

Leu Ser Cys Tyr Gln Val Tyr Cys Gly Arg Tyr Ile Asn Gly His
1325 1330 1335

Met Leu Gln His His Gly Asn Ser Gly His Pro Leu Val Leu Ser
1340 1345 1350

Tyr Ile Asp Leu Ser Ala Trp Cys Tyr Tyr Cys Gln Ala Tyr Val
1355 1360 1365

His His Gln Ala Leu Leu Asp Val Lys Asn Ile Ala His Gln Asn
1370 1375 1380

Lys Phe Gly Glu Asp Met Pro His Pro His Val
1385 1390

5 <210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintético
<400> 6

Met Gly Val Thr Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala
1 5 10

15 <210> 7
<211> 159
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintético
<400> 7

Met Val Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala
1 5 10 15

Gly Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu
20 25 30

Phe Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu
35 40 45

Ser Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr
50 55 60

25

ES 2 803 503 T3

Glu Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys
65 70 75 80

Val Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr
85 90 95

Gly Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe
100 105 110

Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr
115 120 125

Val Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu
130 135 140

Ile Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Val
145 150 155

<210> 8
<211> 477
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sintético

<400> 8
atggtcttca cactcgaaga tttcgttggg gactggcgac agacagccgc ctacaacctg 60
gaccaagtcc ttgaacaggg aggtgtgtcc agtttgtttc agaatctcgc cgtgtccgta 120
actccgatcc aaaggattgt cctgagcggg gaaaatgggc tgaagatcga catccatgtc 180
atcatcccgt atgaaggtct gagcgccgac caaatggccc agatcgaaaa aatttttaag 240
gtggtgtacc ctgtggatga tcatcacttt aaggtgatcc tgcactatgg cacactggta 300
atcgacgggg ttacgccgaa catgatcgac tatttcggac ggccgtatga aggcacgcc 360
gtgttcgacg gcaaaaagat cactgtaaca gggaccctgt ggaacggcaa caaattatc 420
gacgagcgcc tgatcaacct cgacggctcc ctgctgttcc gagtaacct caacgtt 477

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de ensayo que comprende:
- 5 (a) una biblioteca de agentes bioactivos, cada uno de los cuales está fijado a un fluoróforo;
(b) una diana celular fusionada a un indicador bioluminiscente, en donde la diana celular es un compañero de unión de al menos uno de los agentes bioactivos; y
(c) un sustrato para el indicador bioluminiscente
- 10 en donde el espectro de emisión del indicador bioluminiscente se superpone con el espectro de absorción de los fluoróforos; y en donde el agente bioactivo es una molécula pequeña.
2. Un sistema de ensayo que comprende:
- 15 (a) un agente bioactivo fijado a un fluoróforo;
(b) una pluralidad de dianas celulares cada una de las cuales está fusionada a un indicador bioluminiscente, en donde al menos una de las dianas celulares es un compañero de unión del agente bioactivo; y
(c) un sustrato para los indicadores bioluminiscentes
- 20 en donde el espectro de emisión del indicador bioluminiscente se superpone con el espectro de absorción del fluoróforo; y en donde el agente bioactivo es una molécula pequeña.
3. El sistema de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el fluoróforo es un análogo de carboxirodamina.
- 25 4. El sistema de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el indicador bioluminiscente comprende un polipéptido con al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.
5. El sistema de las reivindicaciones 1 o 2, en el que (a) y (b) están dentro de una célula.
- 30 6. El sistema de la reivindicación 5, en el que (b) se expresa intracelularmente como una fusión.
7. El sistema de la reivindicación 5, en el que (a) se añade extracelularmente y entra en la célula.
8. El sistema de las reivindicaciones 1 o 2, en el que tras la unión del agente bioactivo a la diana celular, la conversión del sustrato en un producto de reacción por el indicador bioluminiscente da como resultado la excitación del fluoróforo por BRET y la emisión de fluorescencia del fluoróforo.
- 35 9. El sistema de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agente bioactivo o el agente bioactivo fijado a un fluoróforo se produce por síntesis química no natural.
- 40 10. Un método para detectar la unión de un agente bioactivo a una diana celular que comprende el sistema de una de las reivindicaciones 1-9; en donde el agente bioactivo es una molécula pequeña.
11. Una célula que comprende los sistemas de una de las reivindicaciones 1-9.

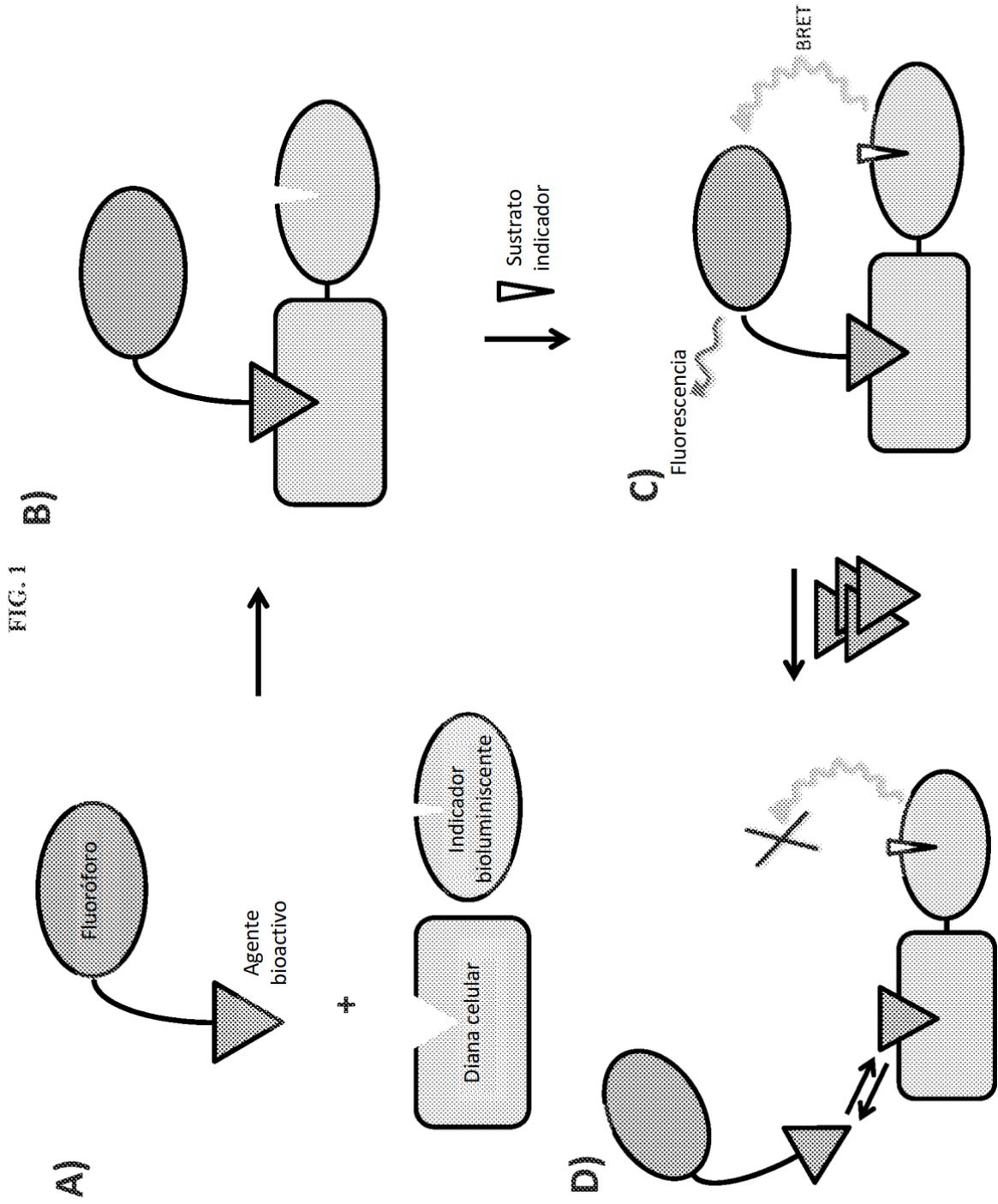


FIG. 2

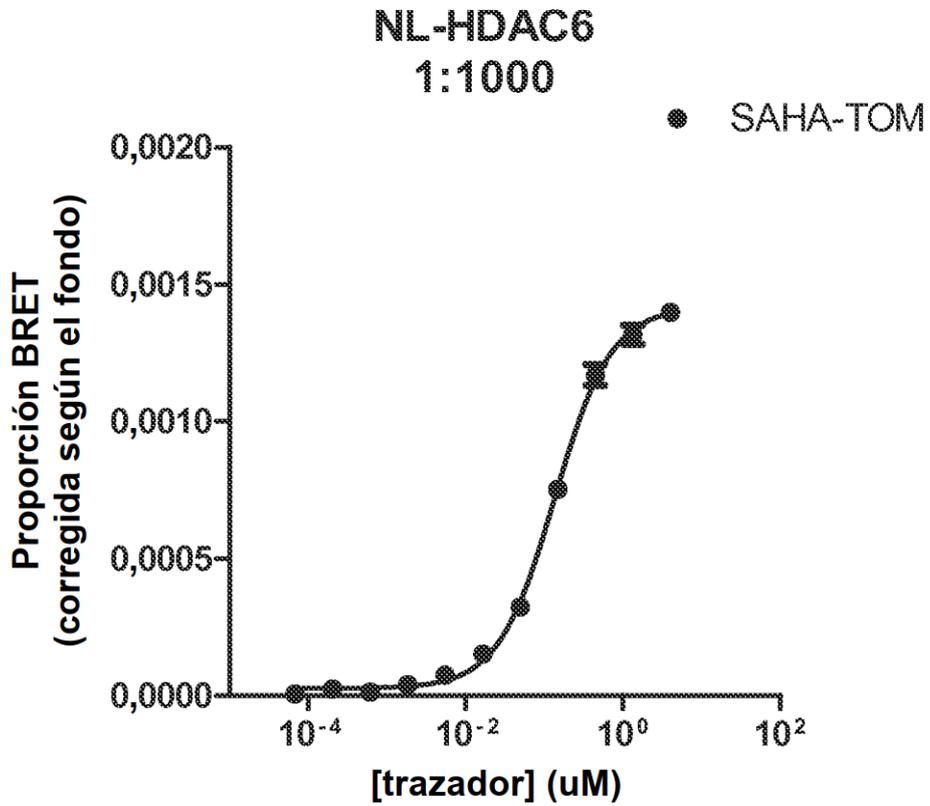
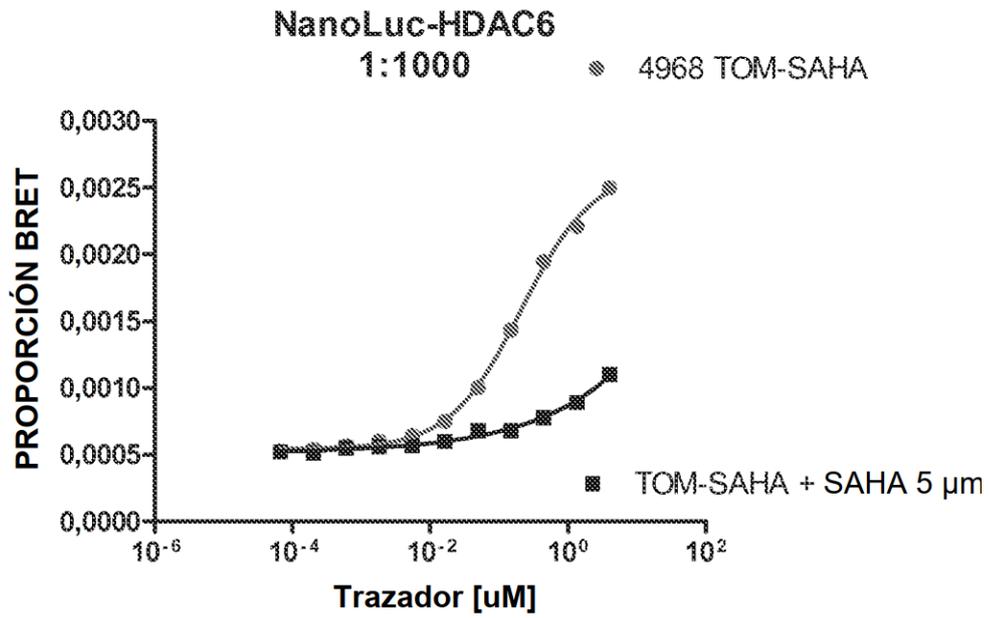


FIG. 2 (cont.)

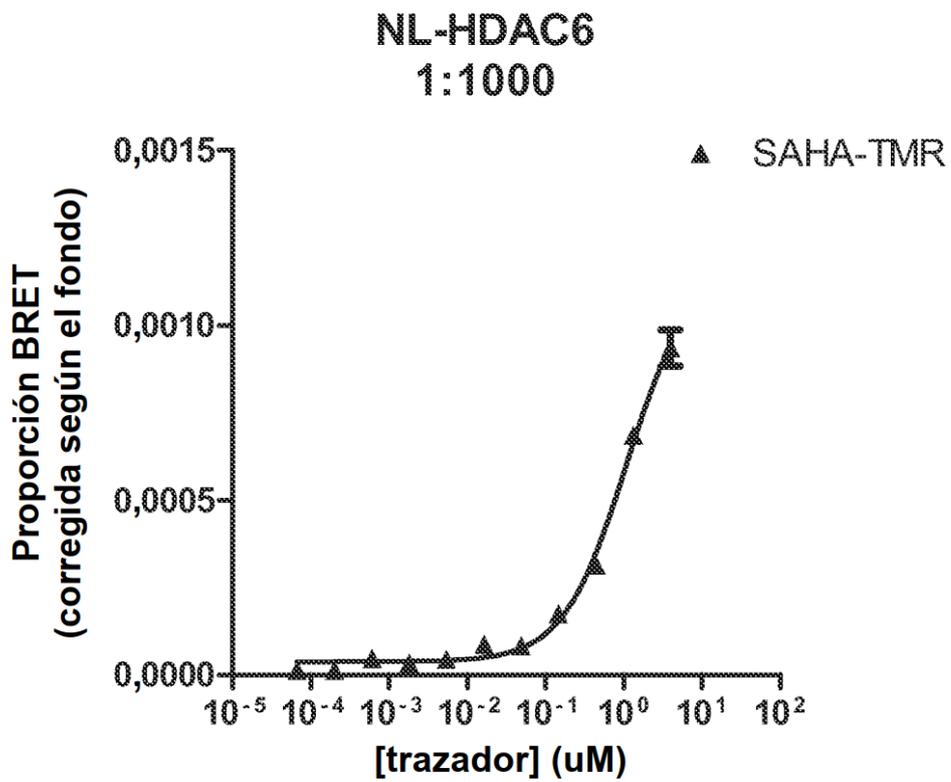
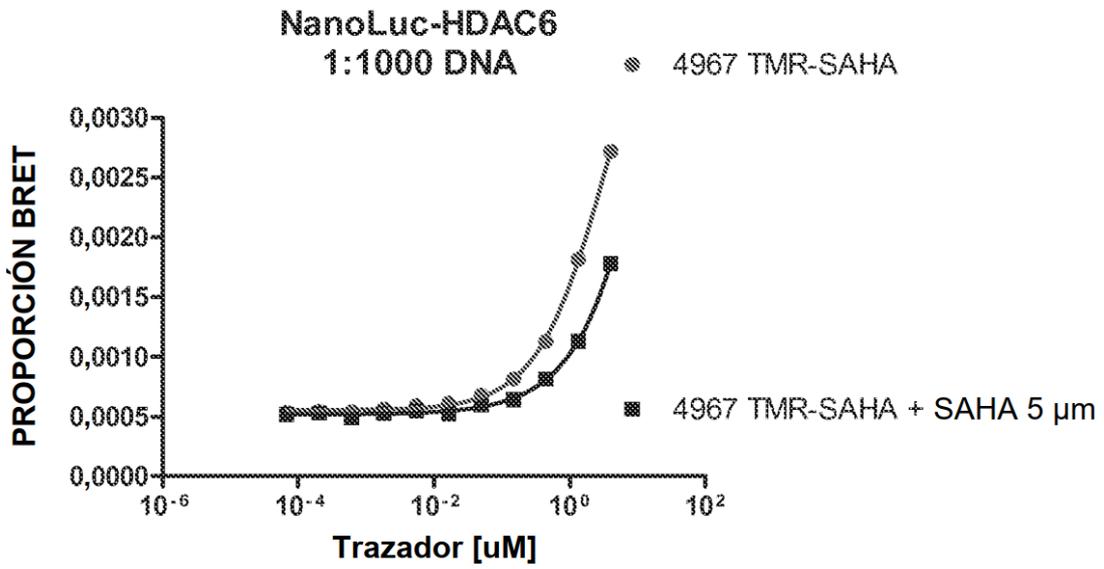


FIG. 3

A)

**Varias diluciones de NLuc-HDAC6
Desplazamiento competitivo del trazador SAHA**

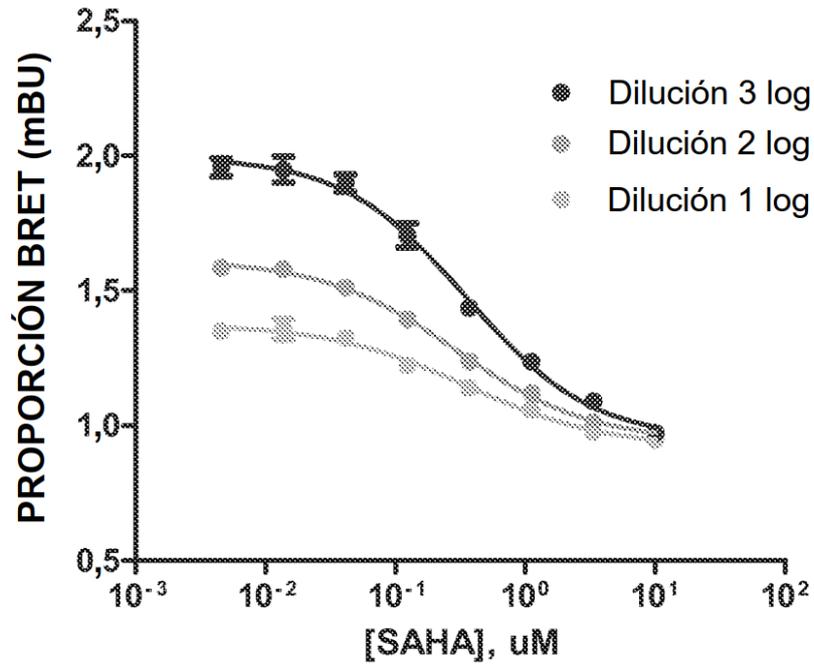


FIG. 3 (cont.)

B) NanoLuc-Histamine H1
Optimización de los niveles de expresión/ trazador

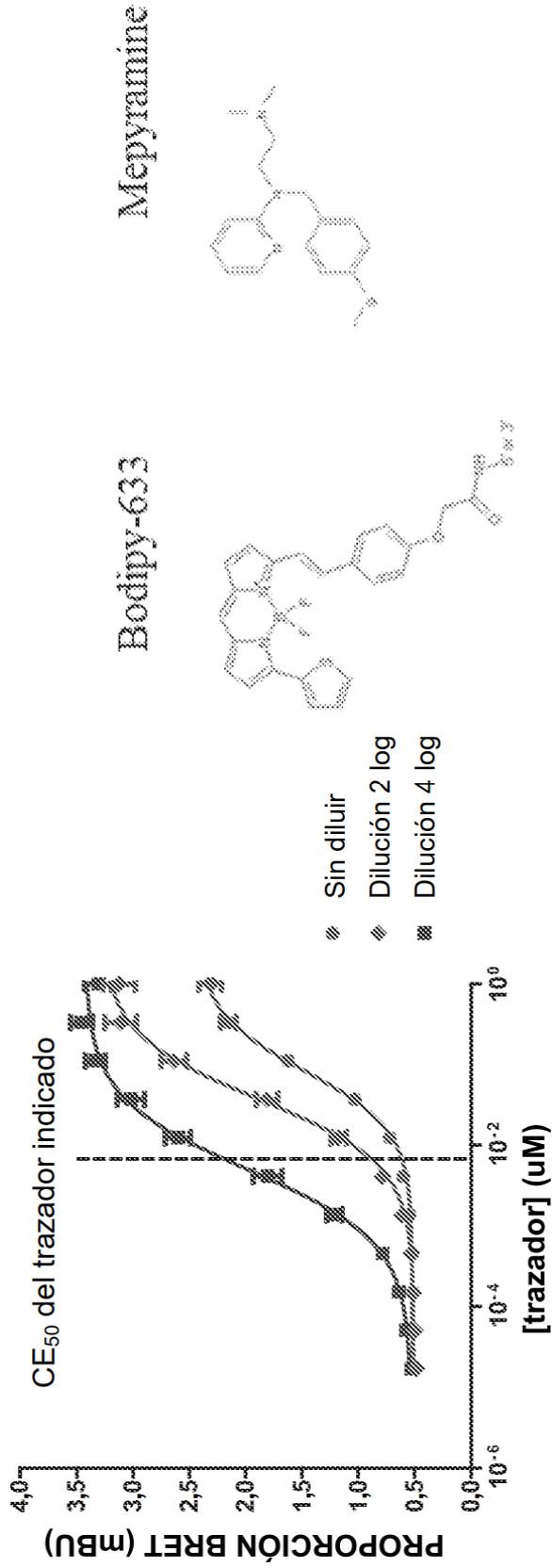


FIG. 4

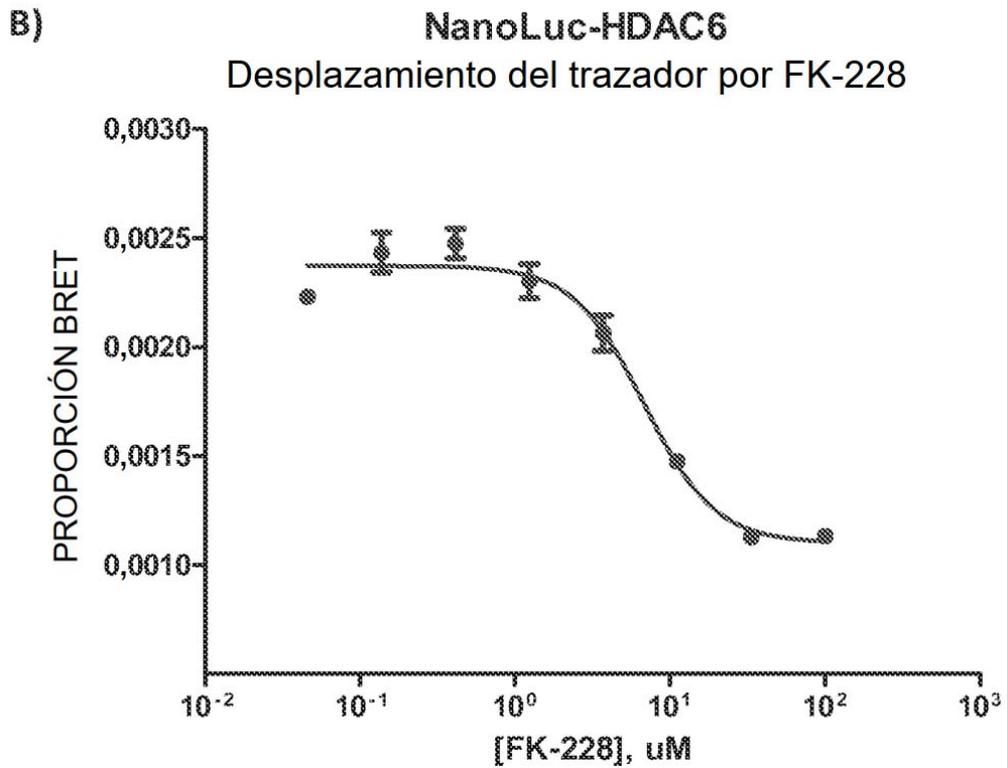
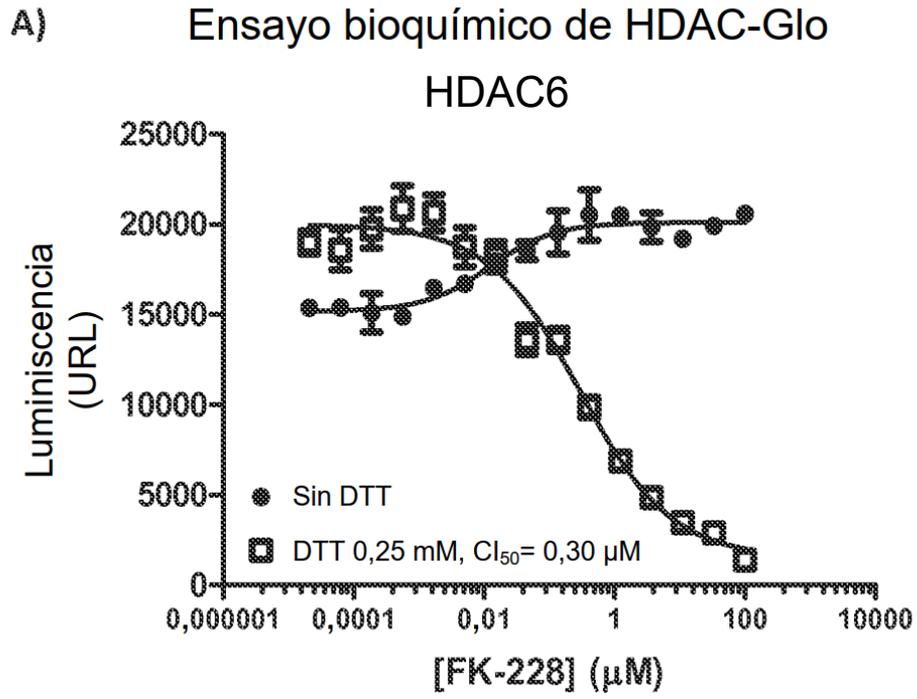


FIG. 5

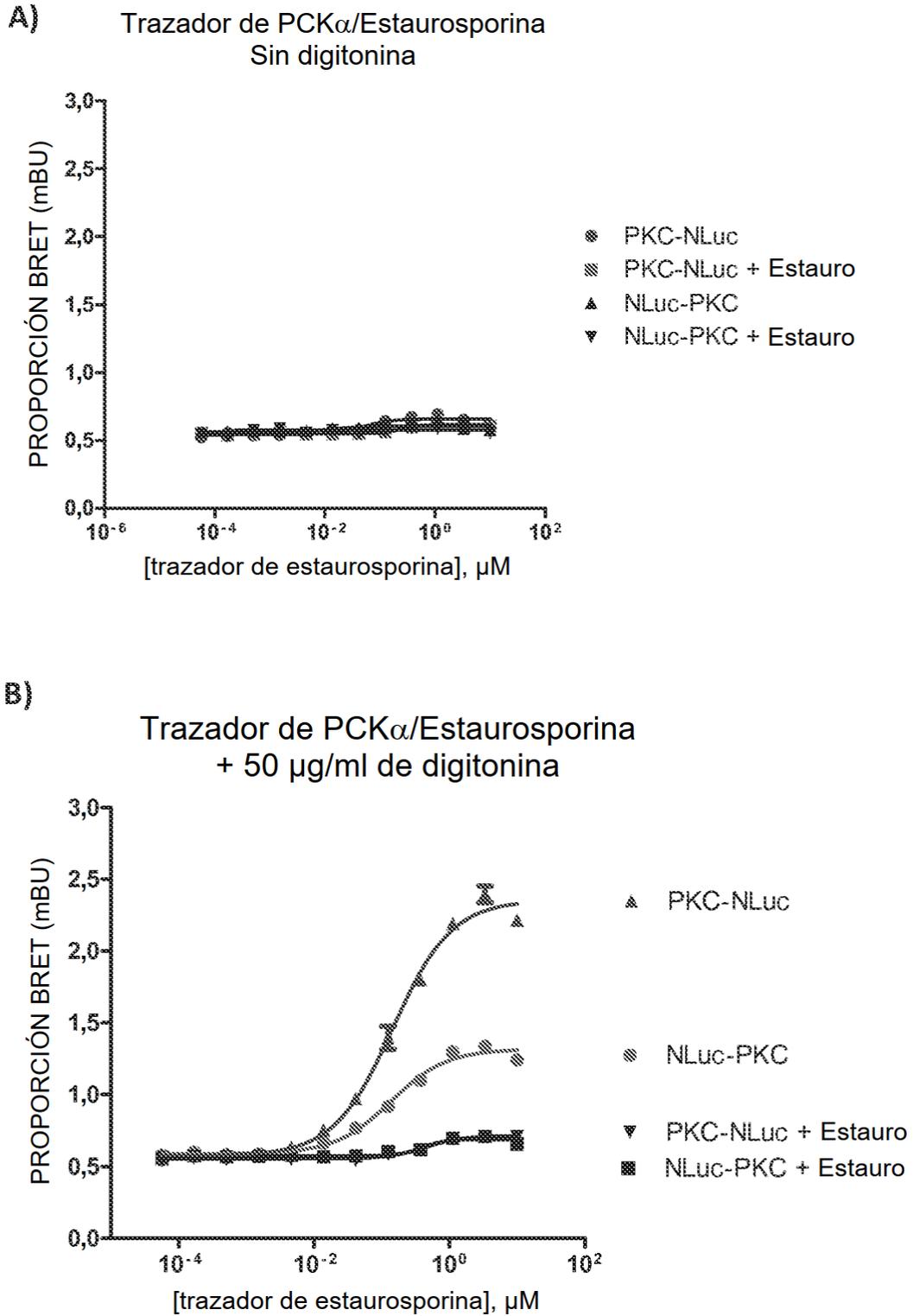


FIG. 5 (cont.)

c)

PCK α -NanoLuc BRET
con trazador de estaurosporina 5 μ M
Efecto de digitonina

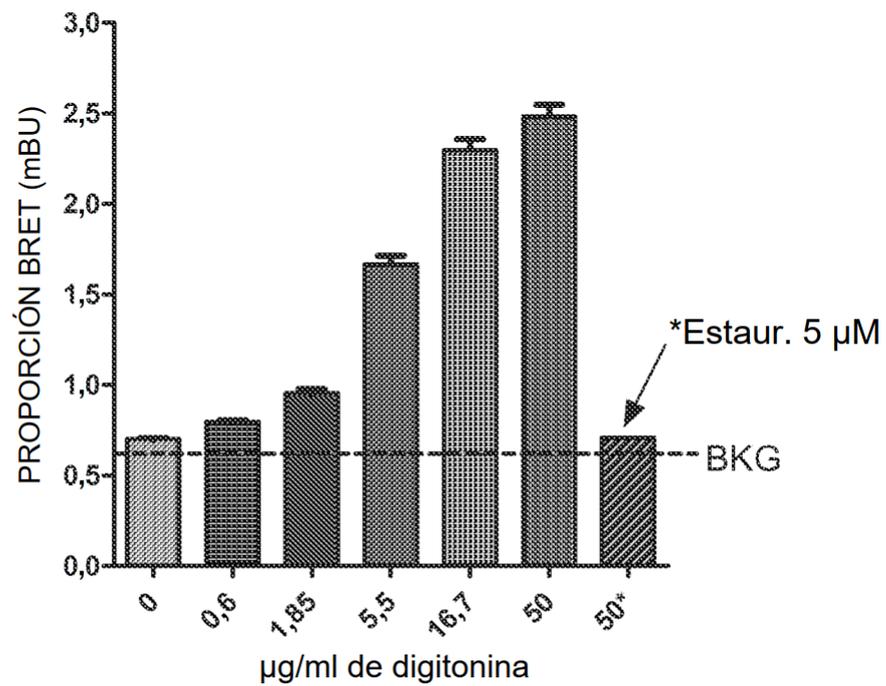


FIG. 6

Desplazamiento competitivo
por inhibidor sin marcar

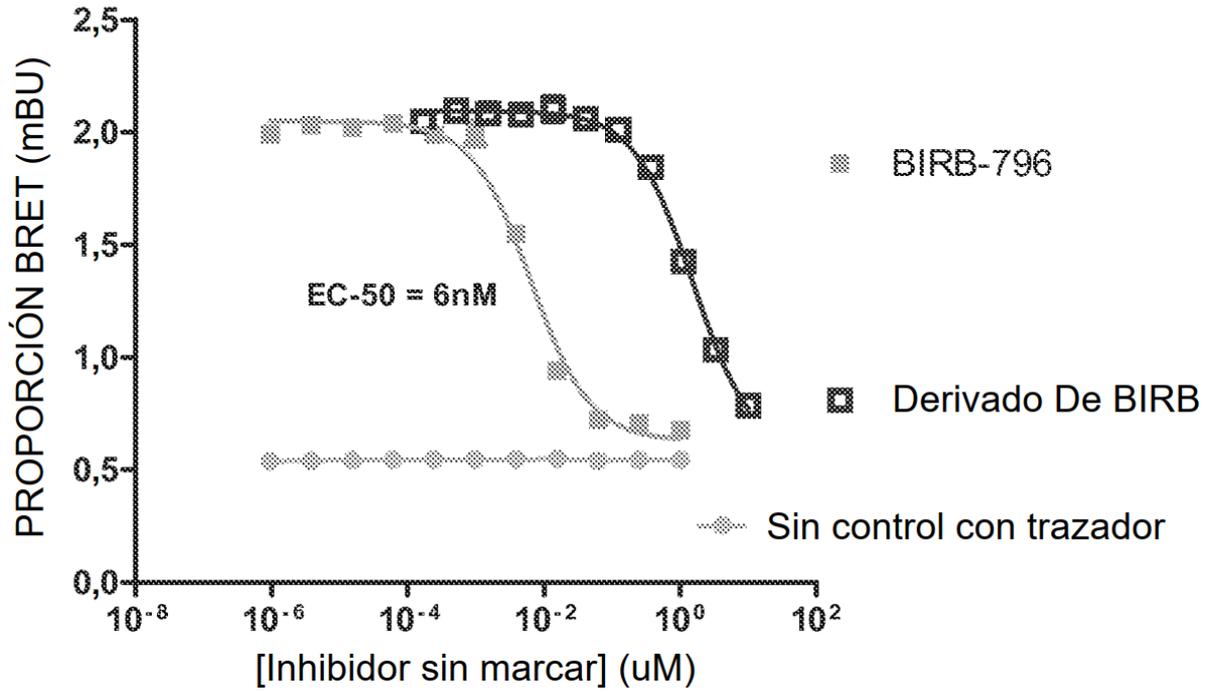
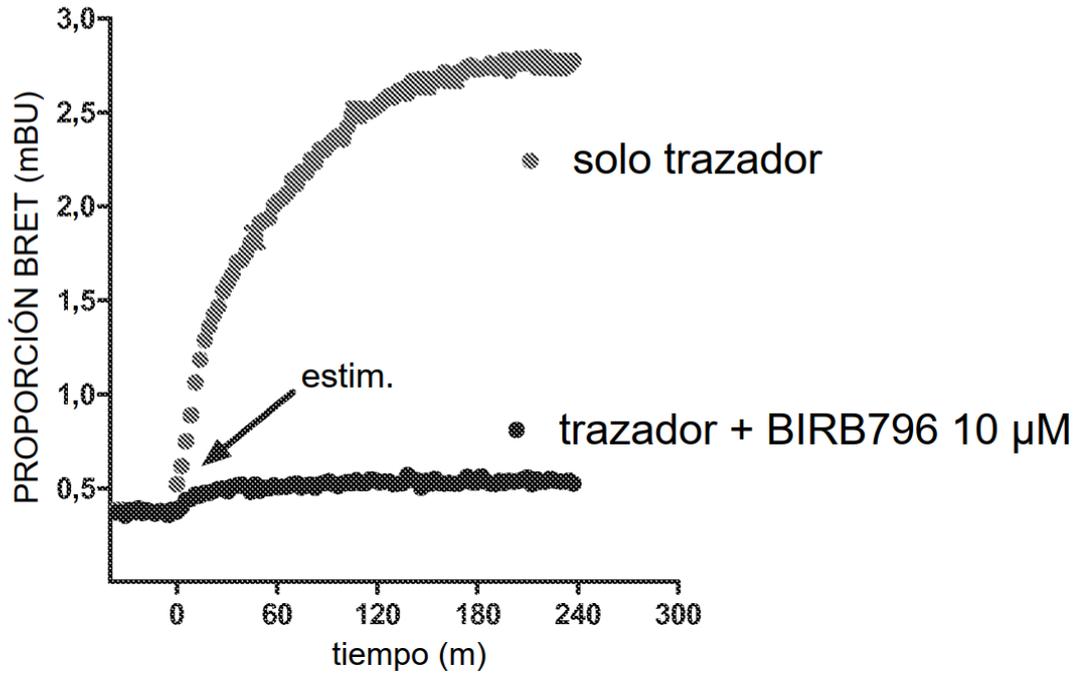


FIG. 7

A) Cinética de la unión del trazador a p38



B) Cinética de la unión del desplazamiento a p38

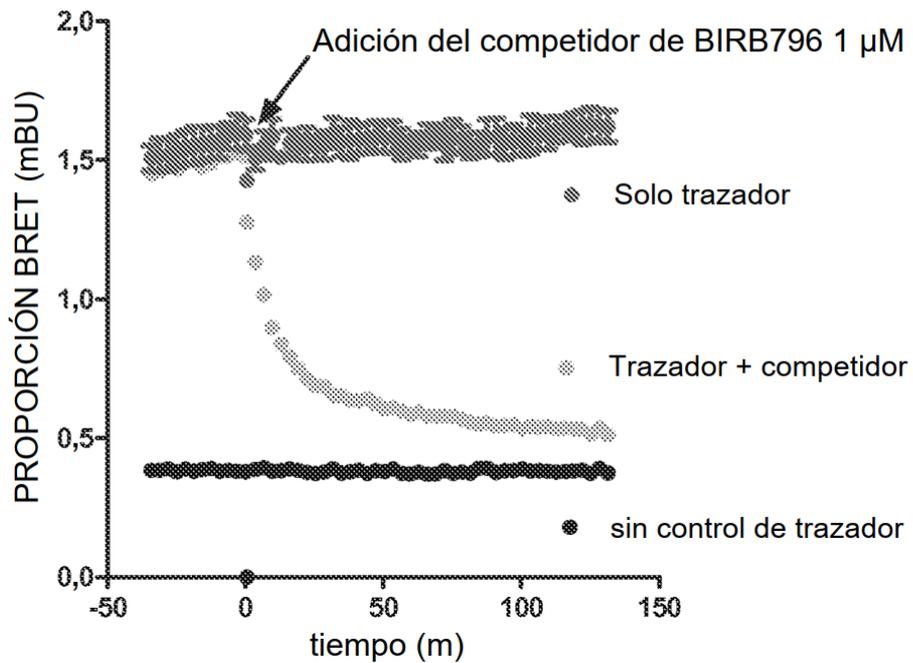
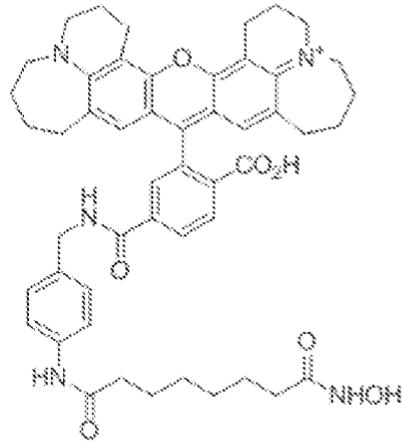
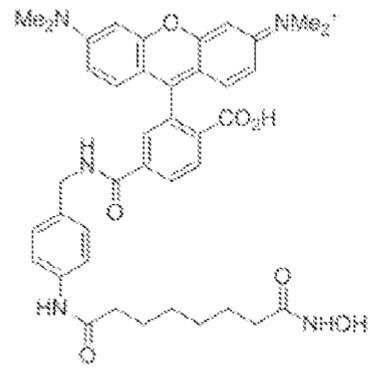


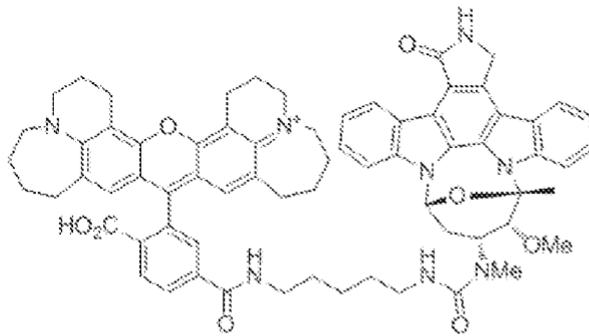
FIG. 8



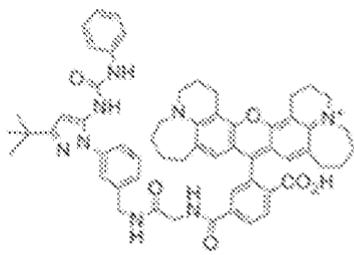
SAHA-TOM (4968)



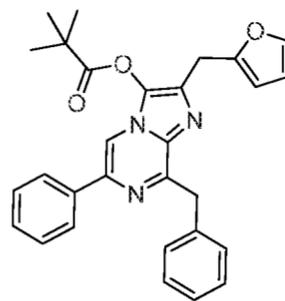
SAHA-TAMRA (4967)



Estaurosporina-TOM (5129)

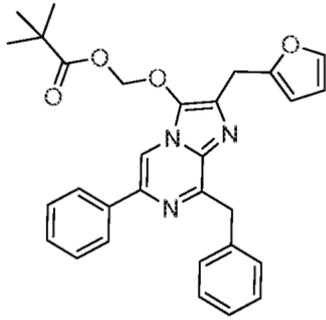


BIRB-TOM (4838)

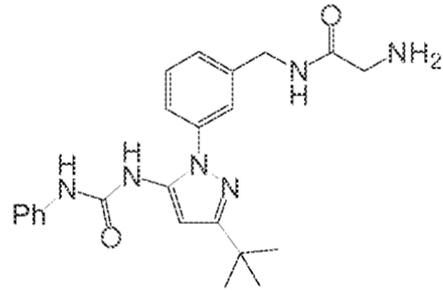


PBI 4378

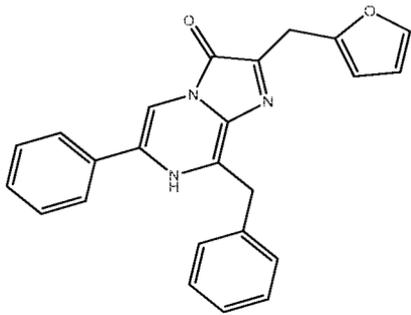
FIG. 8 (cont.)



PBI 4377



PBI 4835



PBI-3939 (furimazina)

FIG. 9

Fusión De luciferasa-p38 en HEK293
Valores de emisión brutos

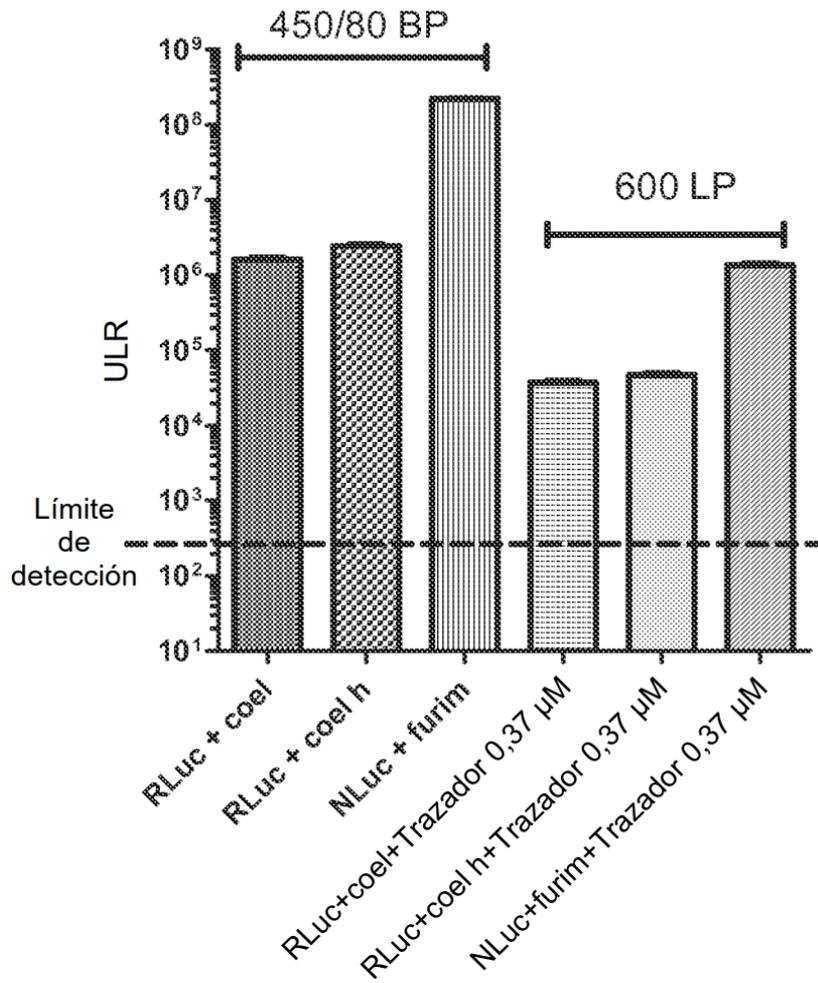


FIG. 9 (cont.)

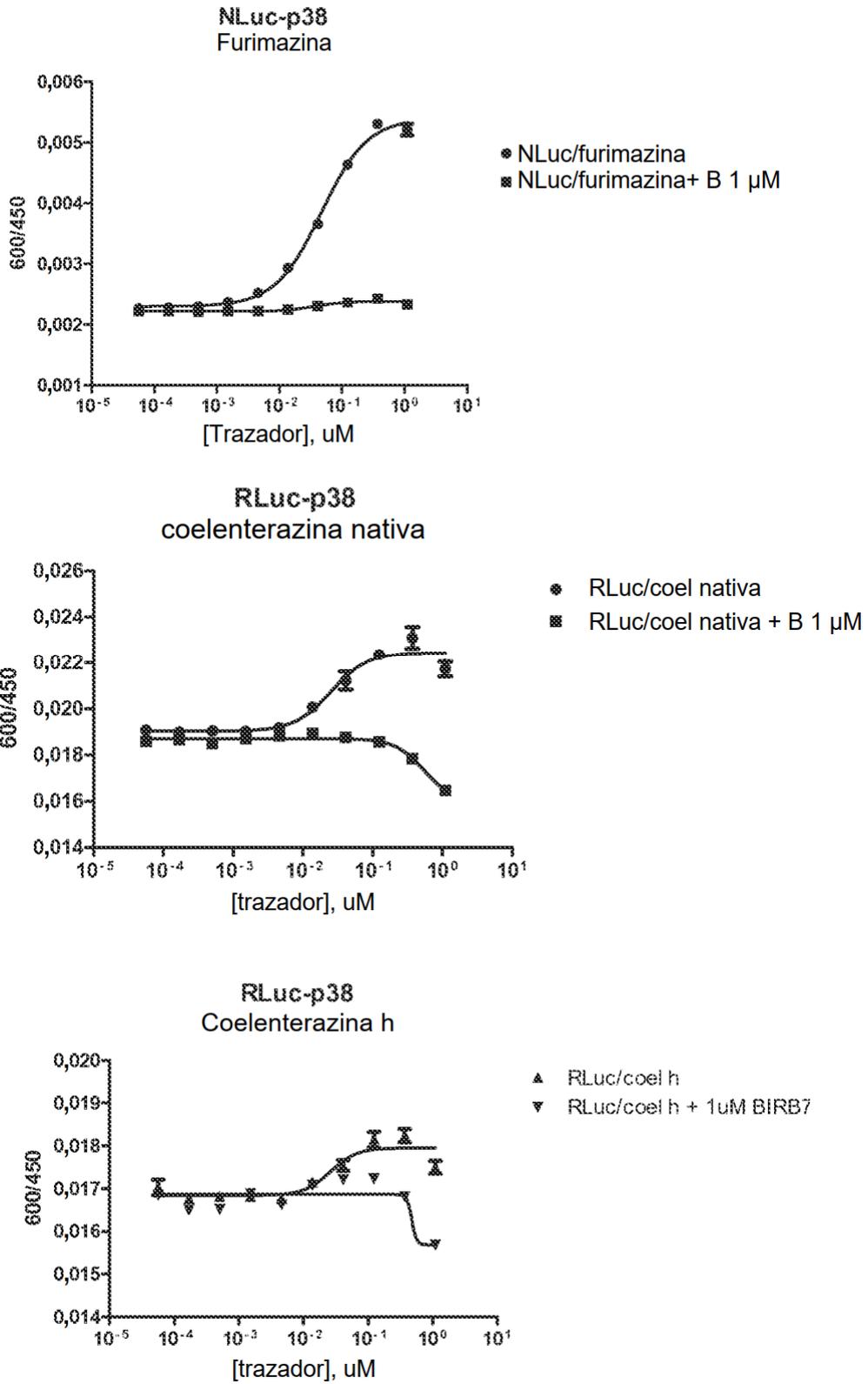


FIG. 10

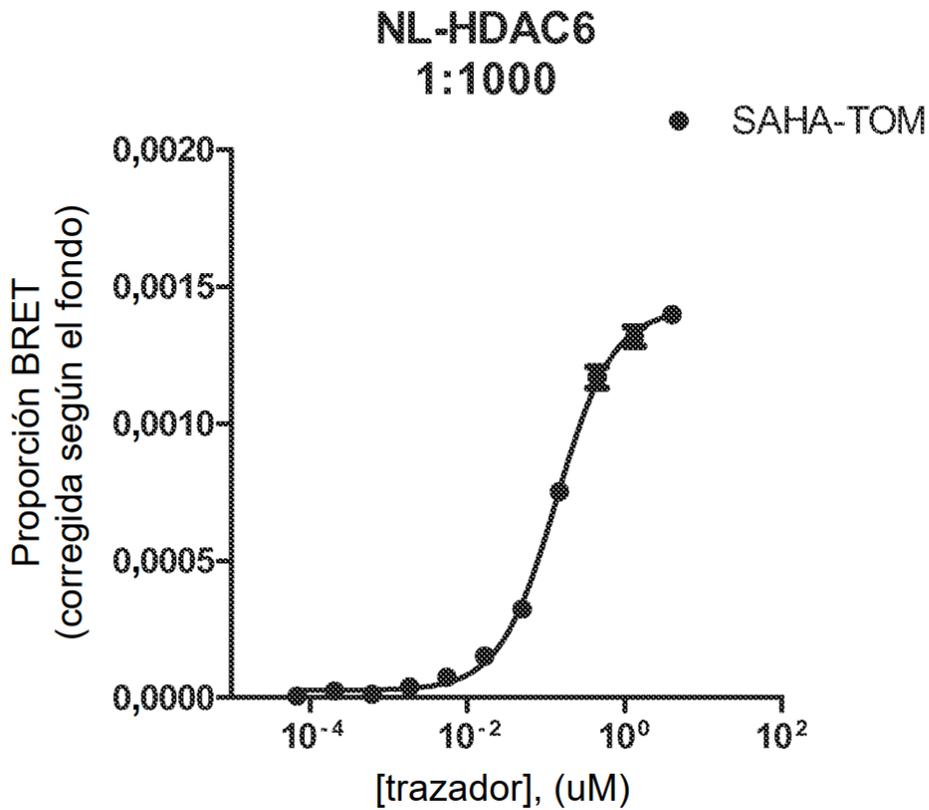
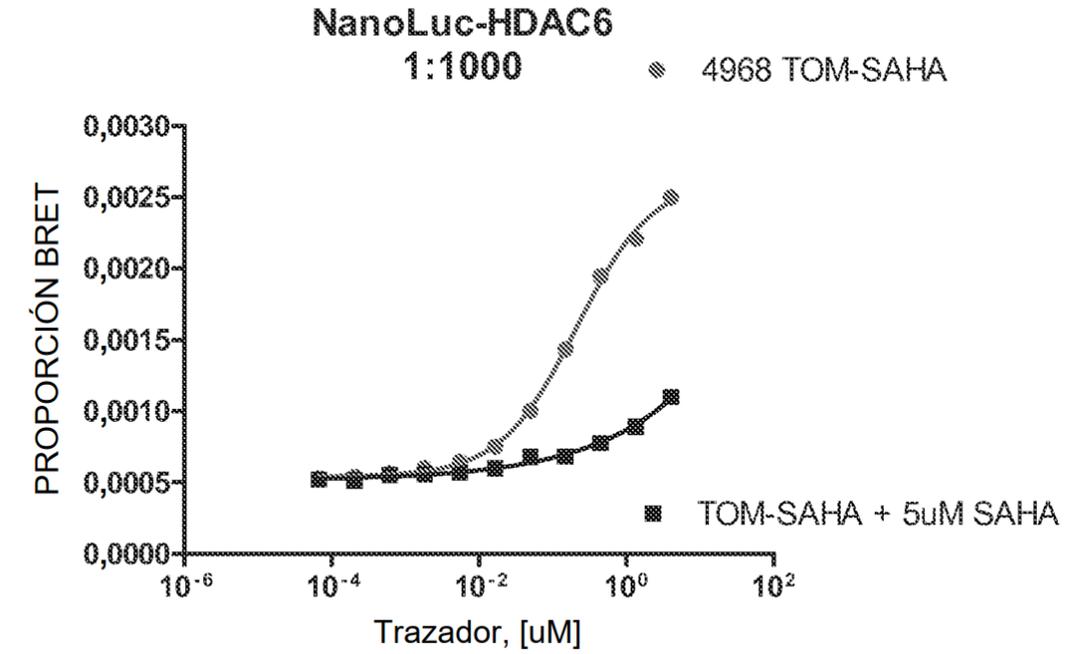


FIG. 10 (cont.)

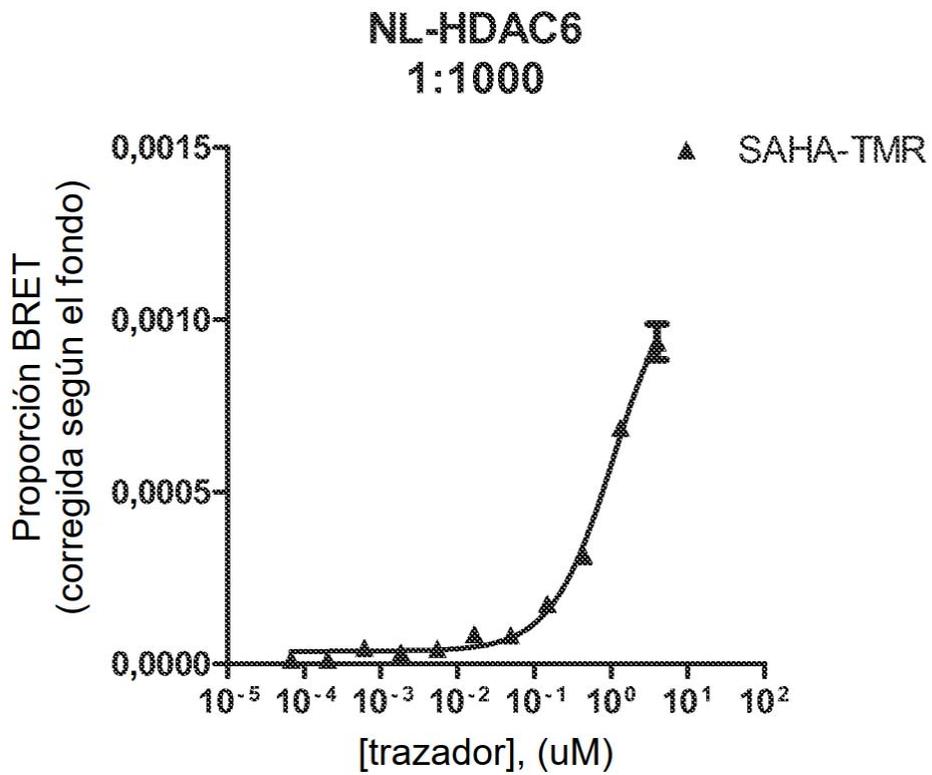
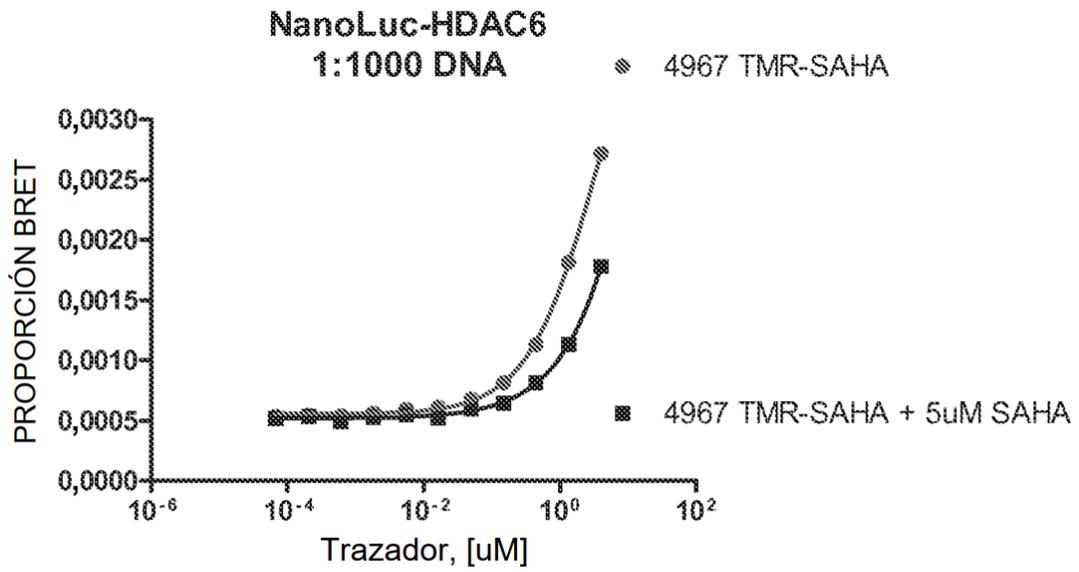


FIG. 11

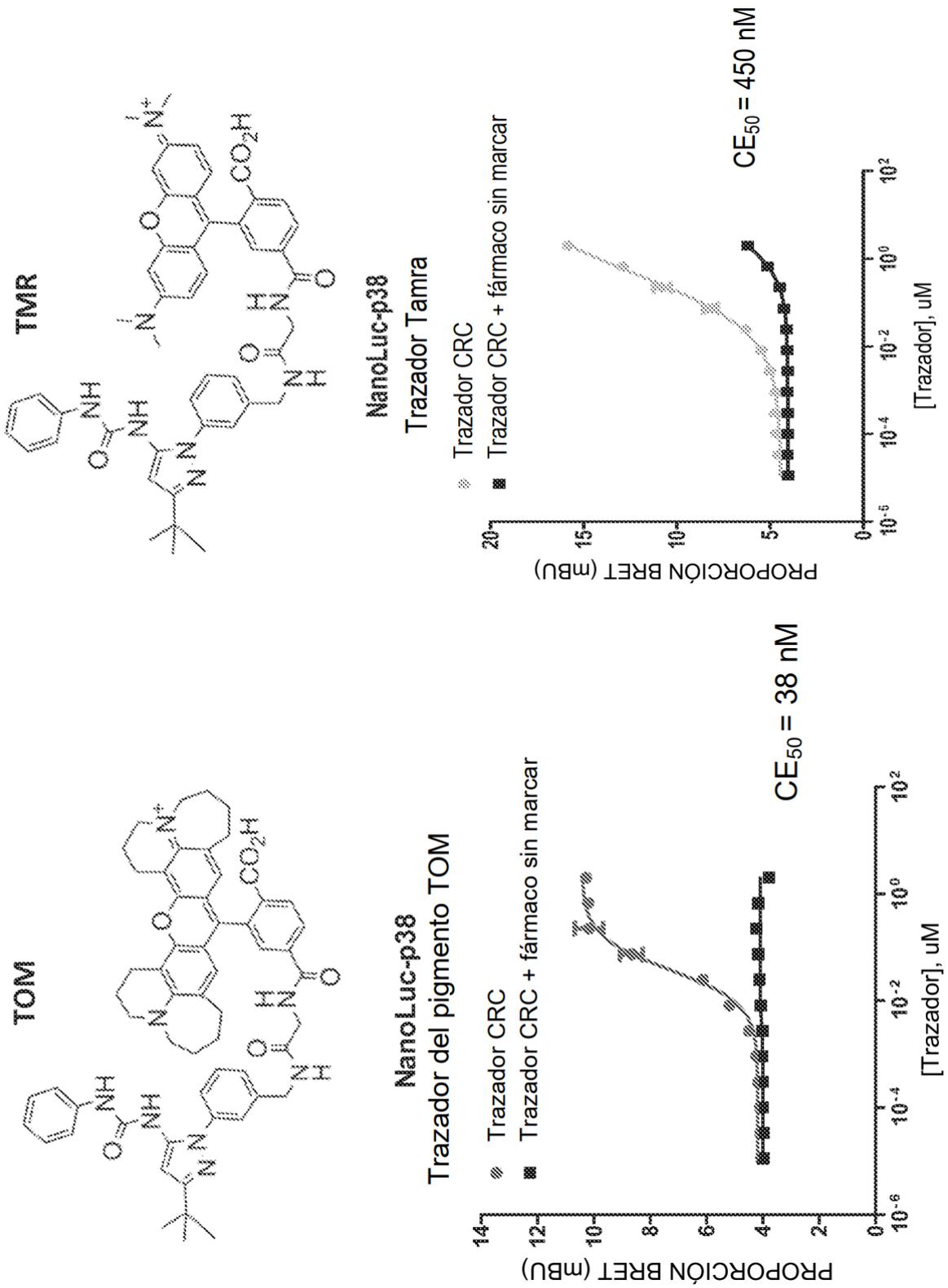


FIG. 12

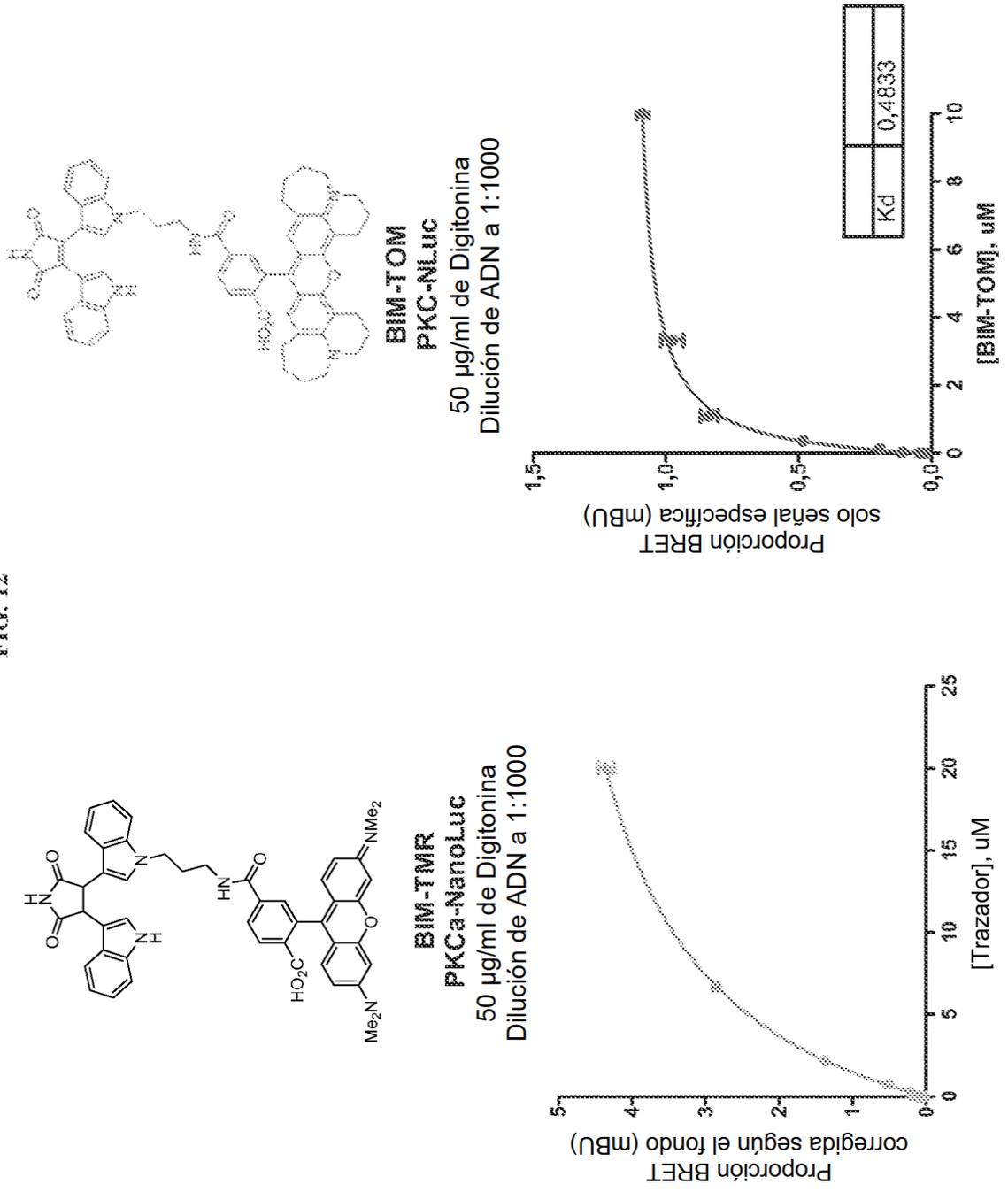


FIG. 13

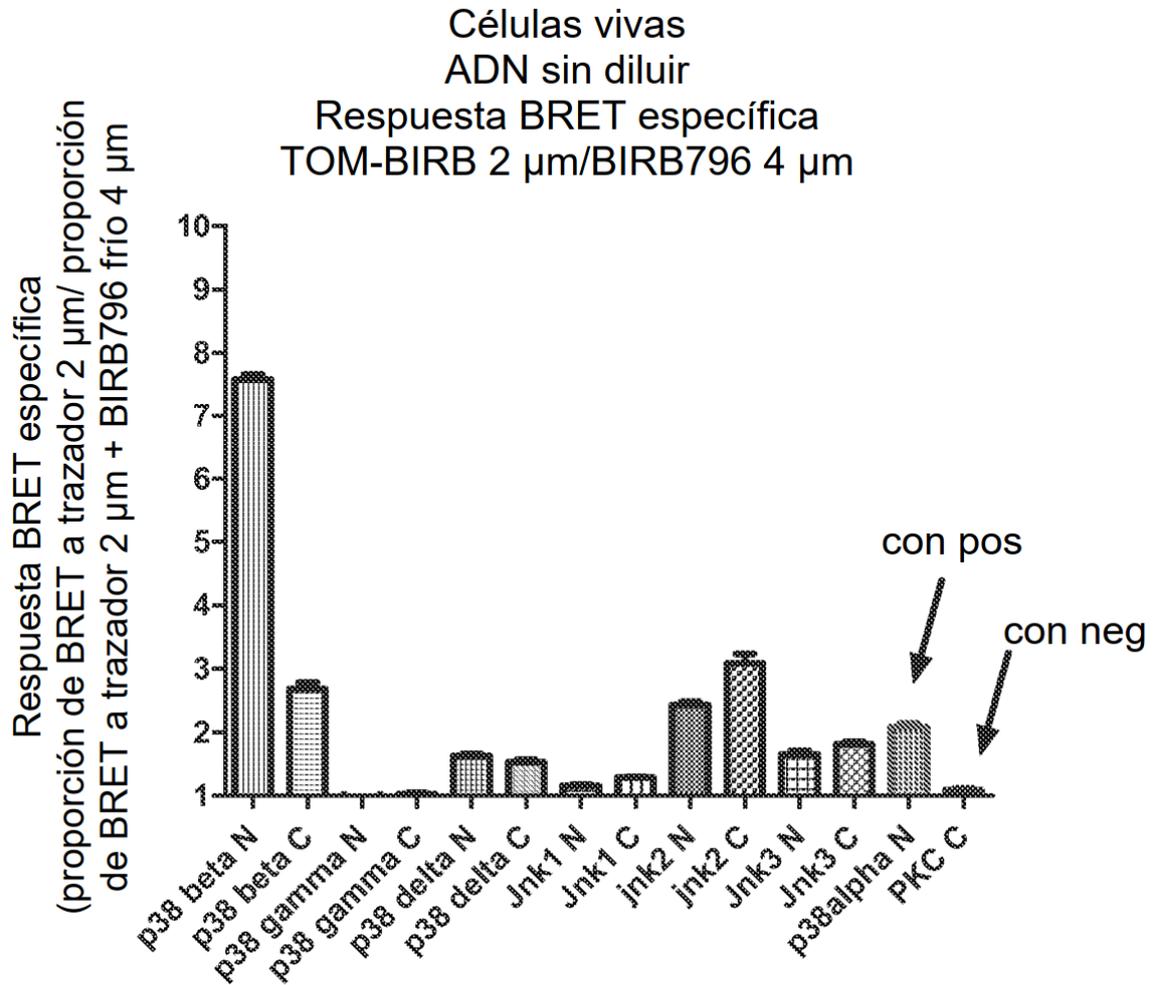
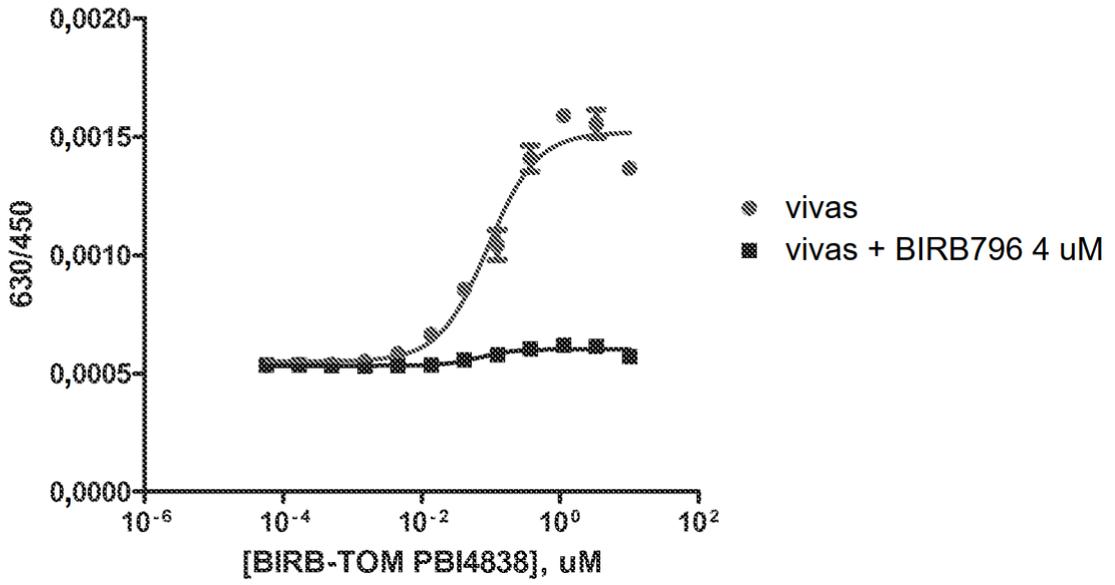


FIG. 14

NL-p38alfa (mapk14)
ADN sin diluir



NL-p38-beta (mapk11)
ADN sin diluir

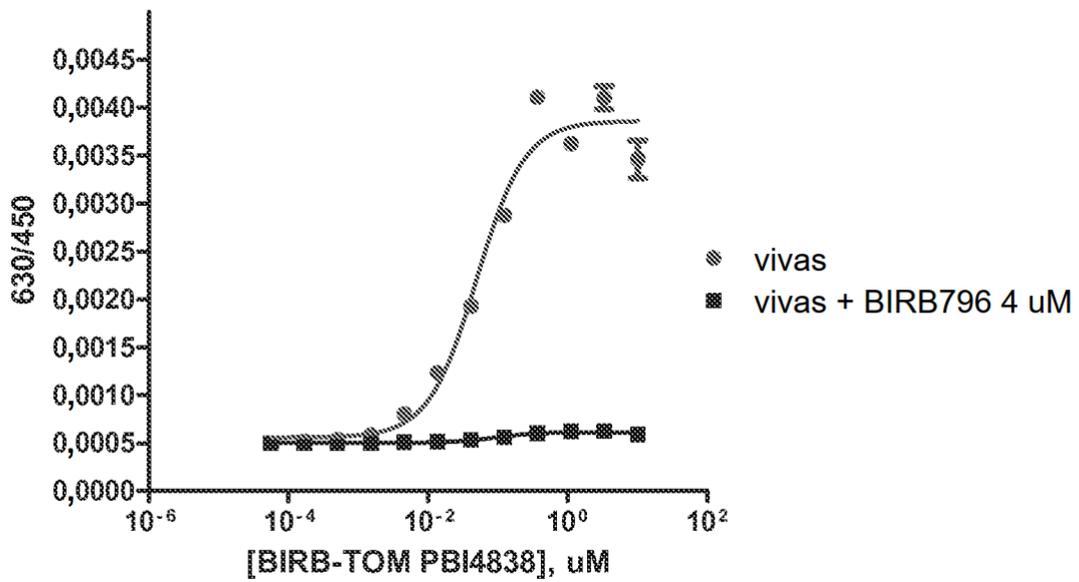


FIG. 14 (cont.)

jnk2-NL (mapk9)
ADN sin diluir

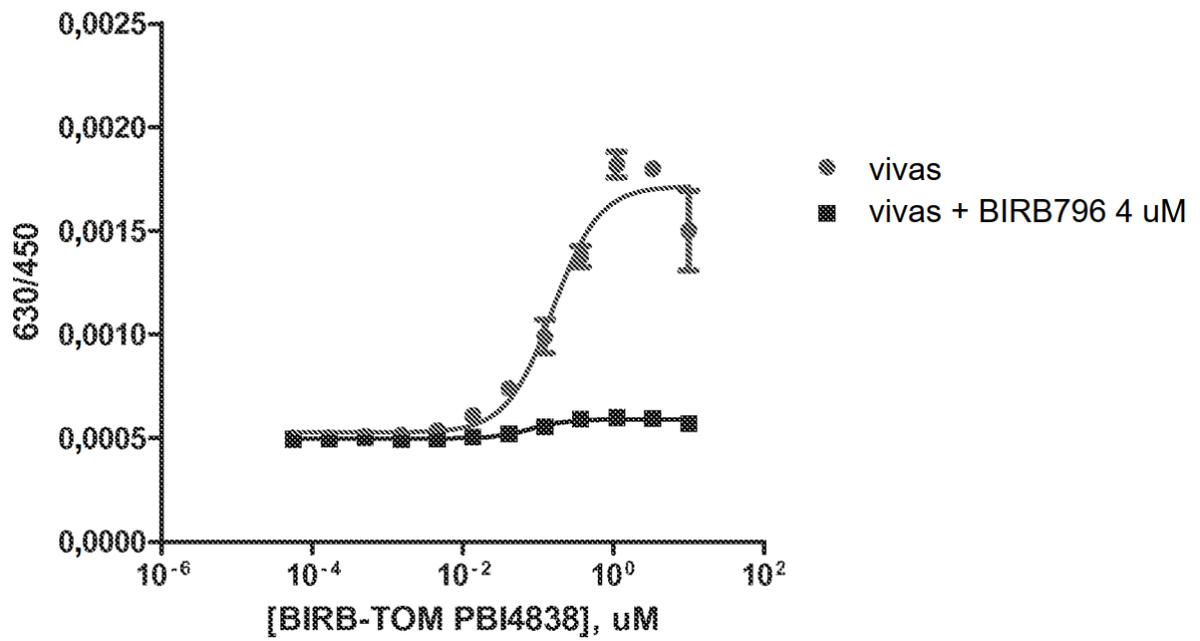
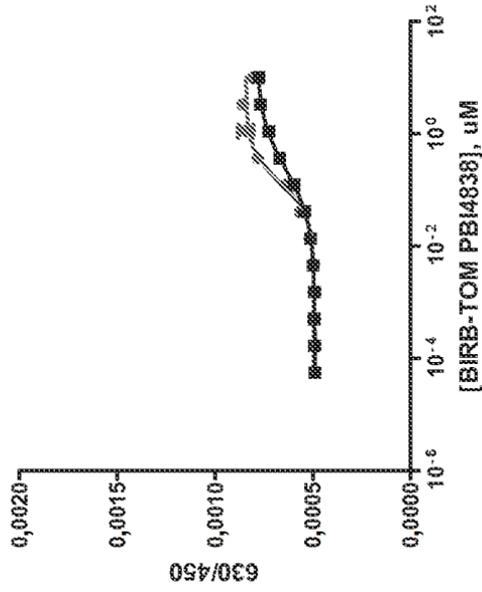


FIG. 14 (cont.)

----- Controles negativos -----

PKCa-NL
ADN sin diluir



NL-HDAC6
ADN sin diluir

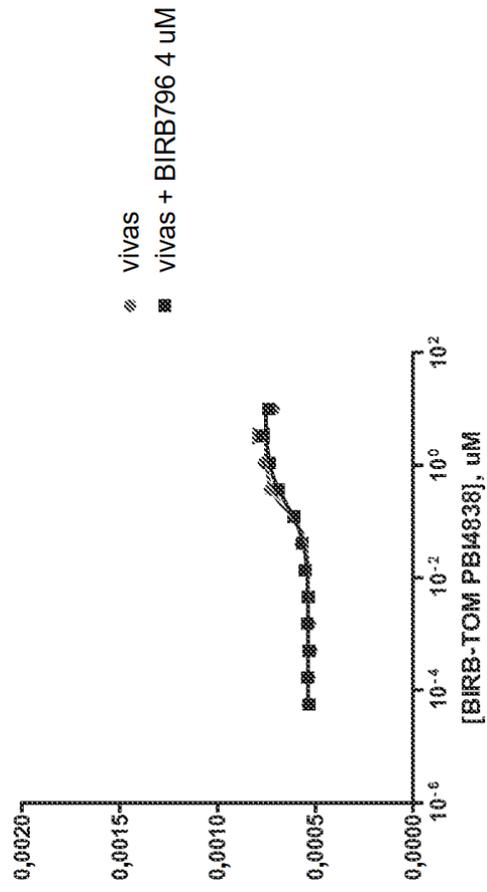
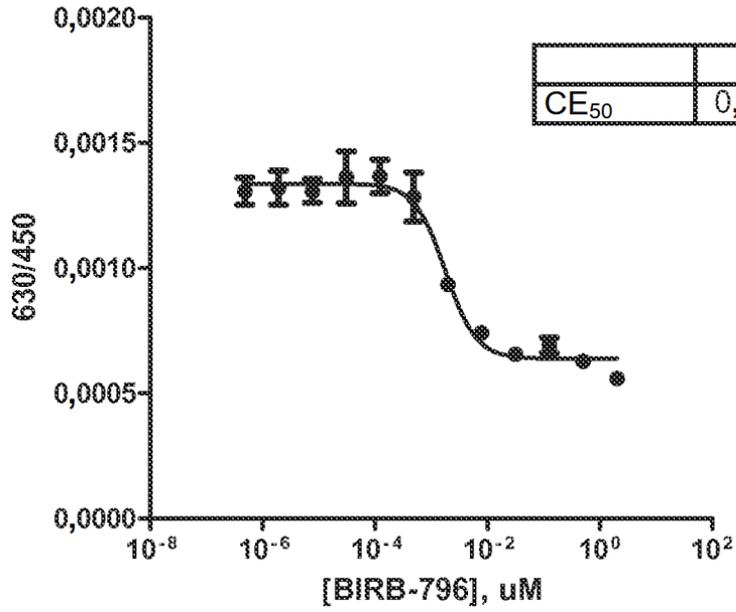


FIG. 15

NLuc-p38alfa
 BIRB-TOM 1 uM
 Células vivas



NLuc-p38beta
 BIRB-TOM 1 uM
 Células vivas

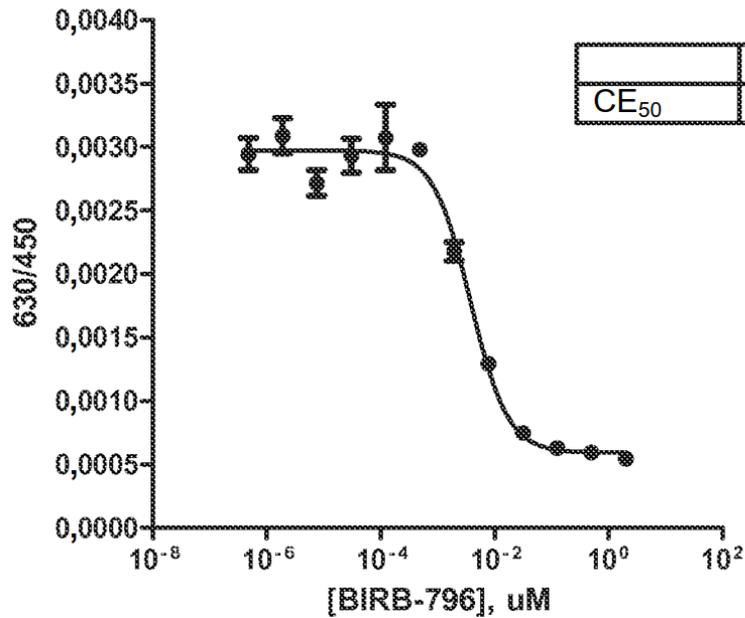


FIG. 15 (cont.)

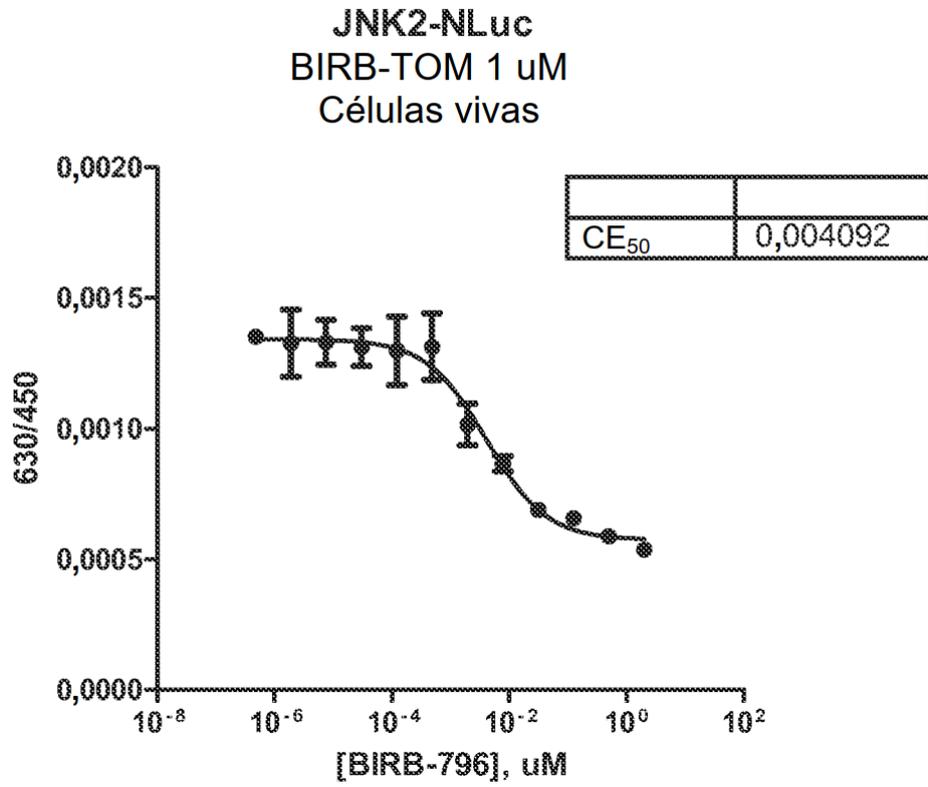
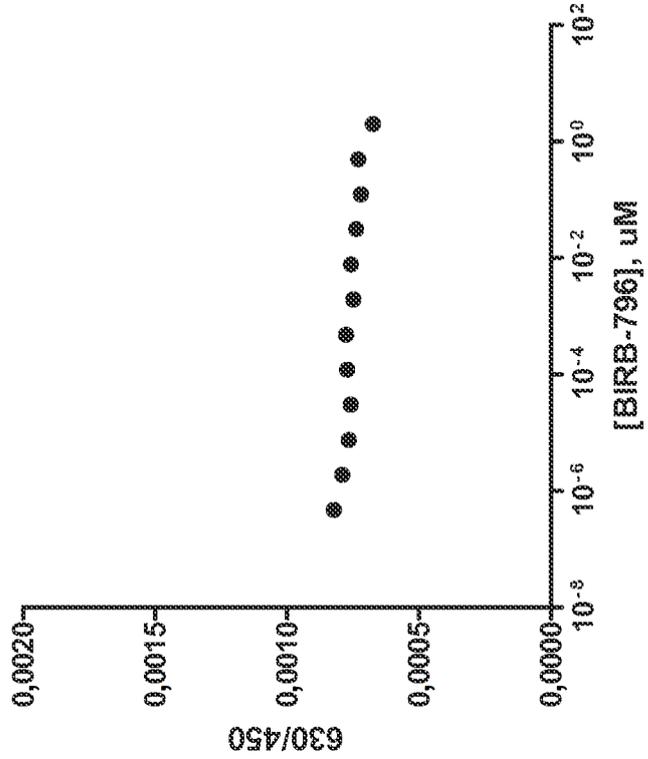


FIG. 15 (cont.)

----- Controles negativos -----

PKC-NLuc
BIRB-TOM 1 μ M
Células vivas



NLuc-HDAC6
BIRB-TOM 1 μ M
Células vivas

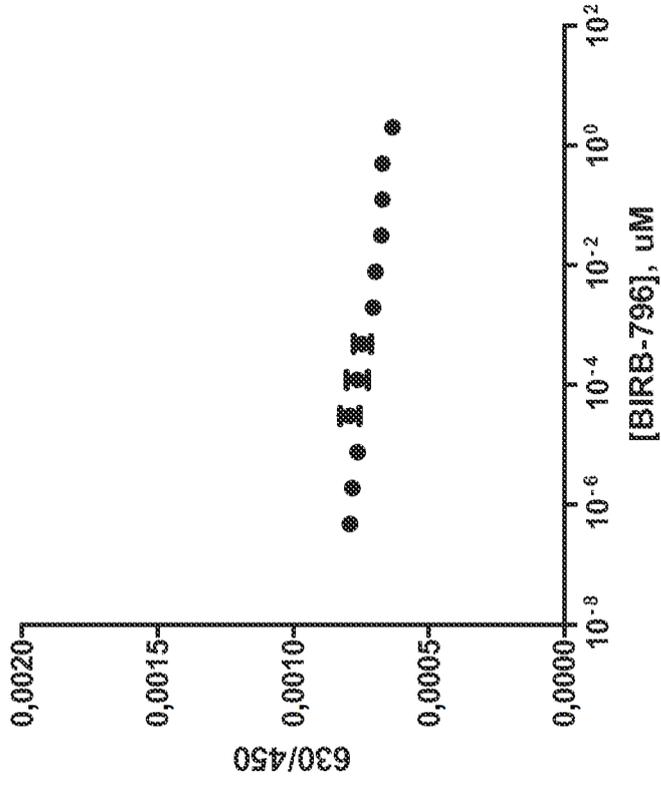
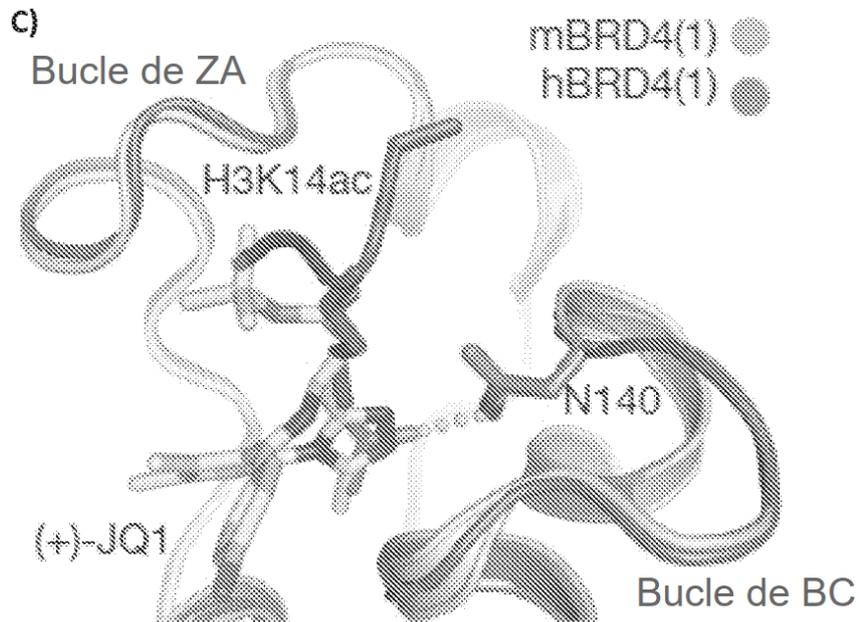


FIG. 16 (cont.)



D)

Afinidad comparativa de Ibet-TOM
por NLuc-BRD4 o mutante de BRD4

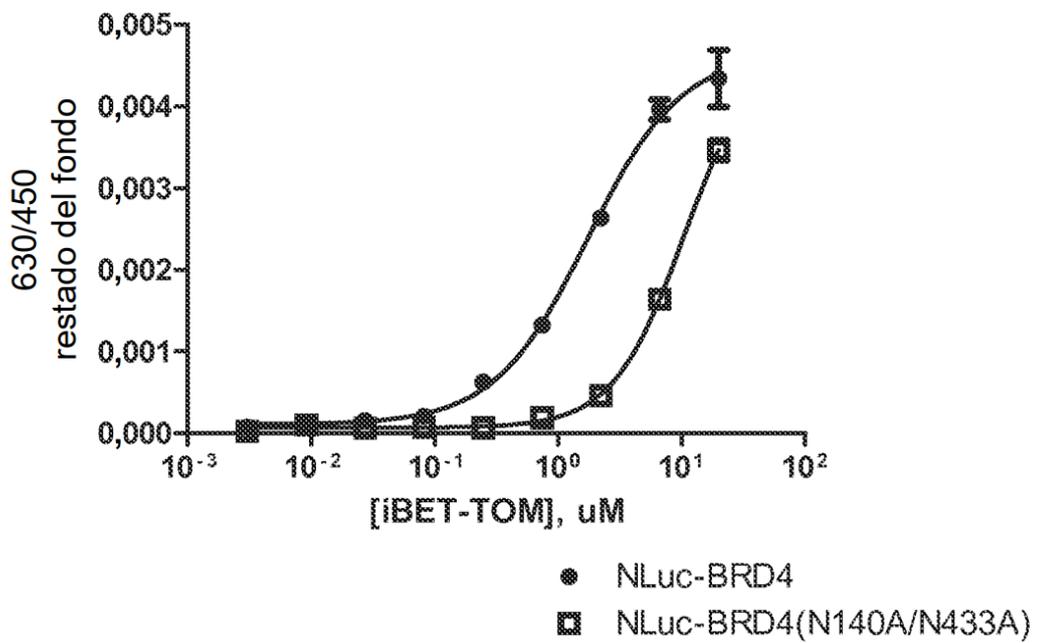
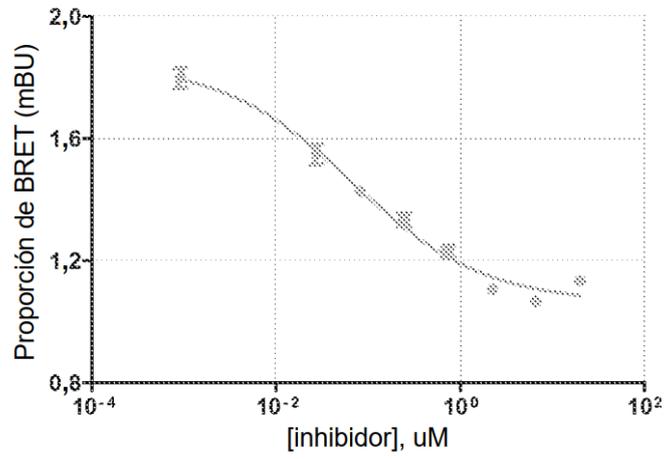
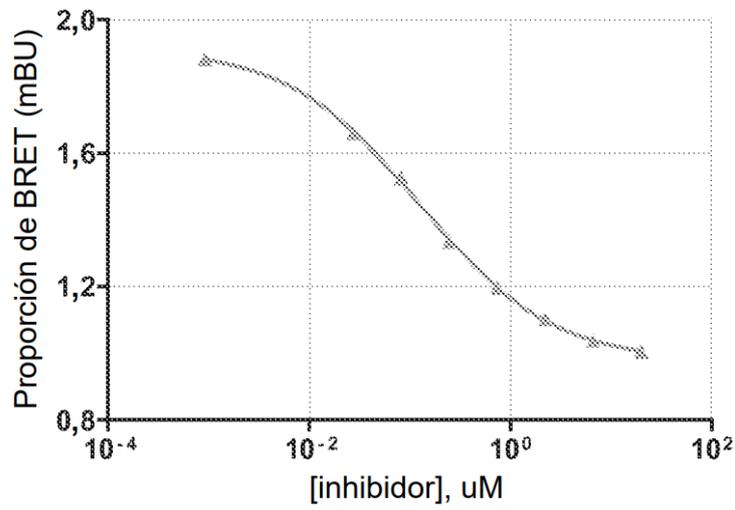


FIG. 17

Tricostatina A



M-344



Panabinstat / LBH589

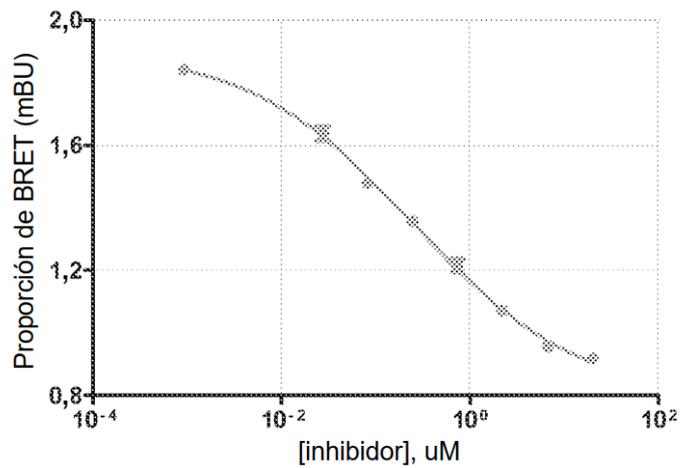
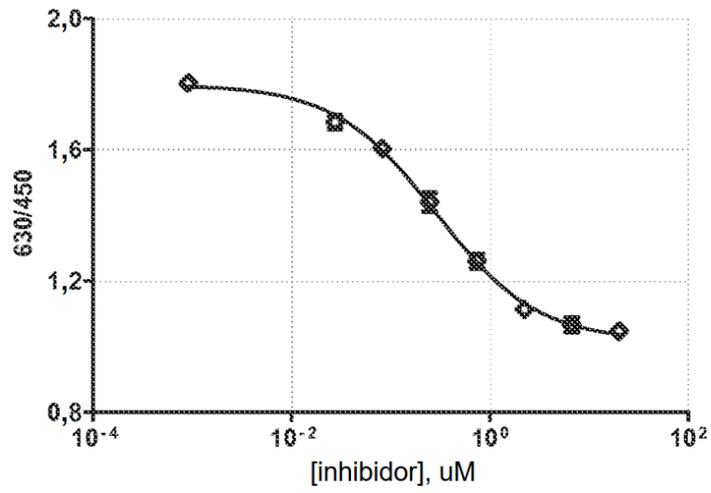
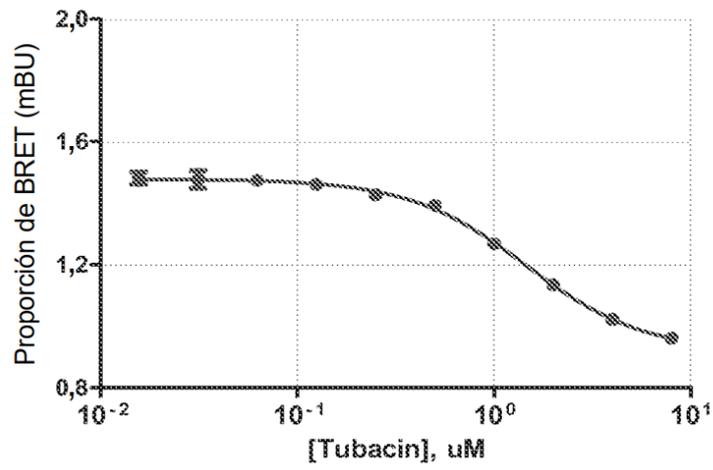


FIG. 17(cont.)

SAHA



Tubacin



FK-228

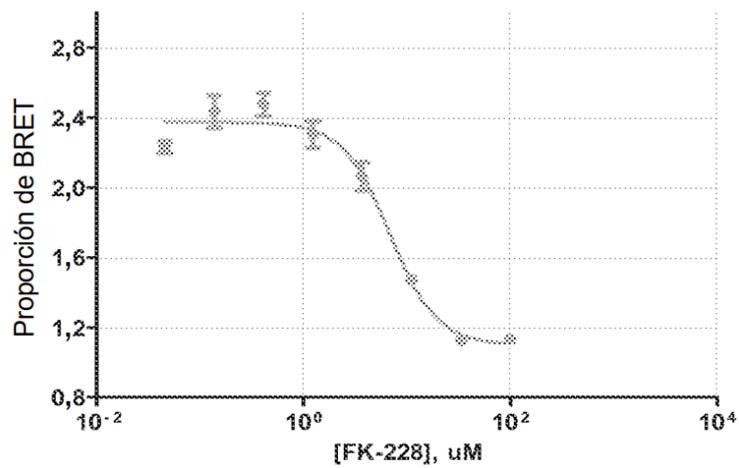
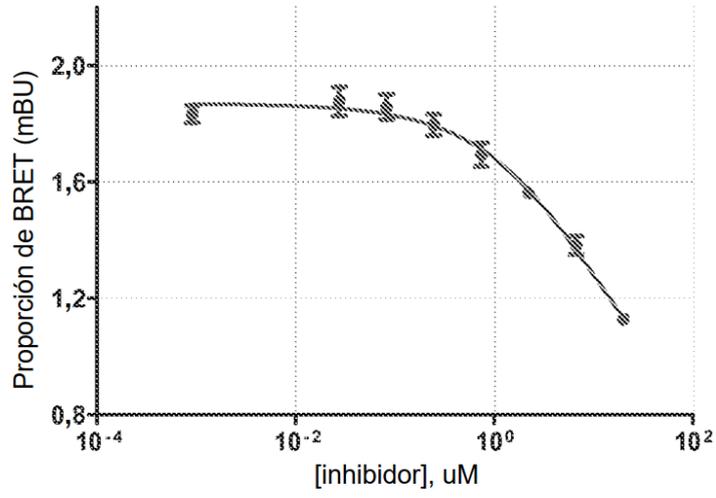
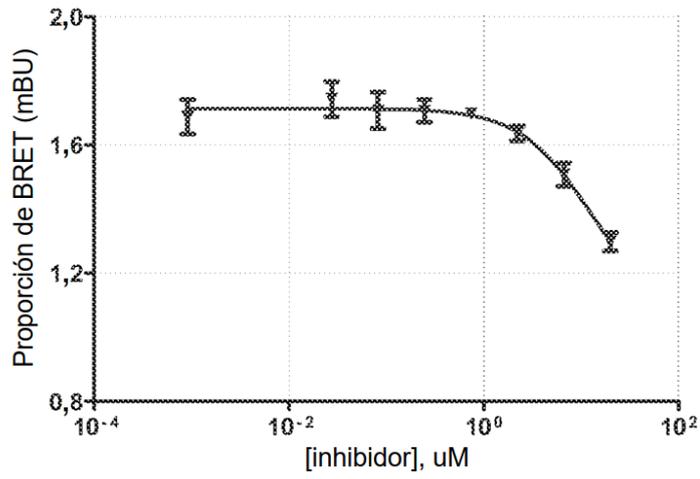


FIG. 17(cont.)

Compuesto 6h



Mocetinostat



Apidicina

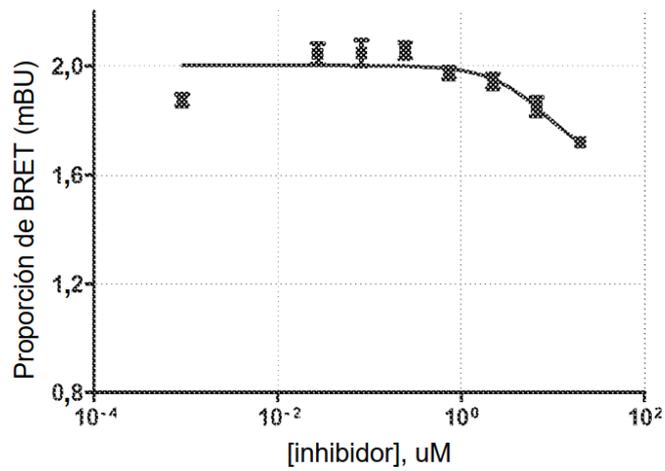


FIG. 18

CDK2-NLuc en células HeLa vivas

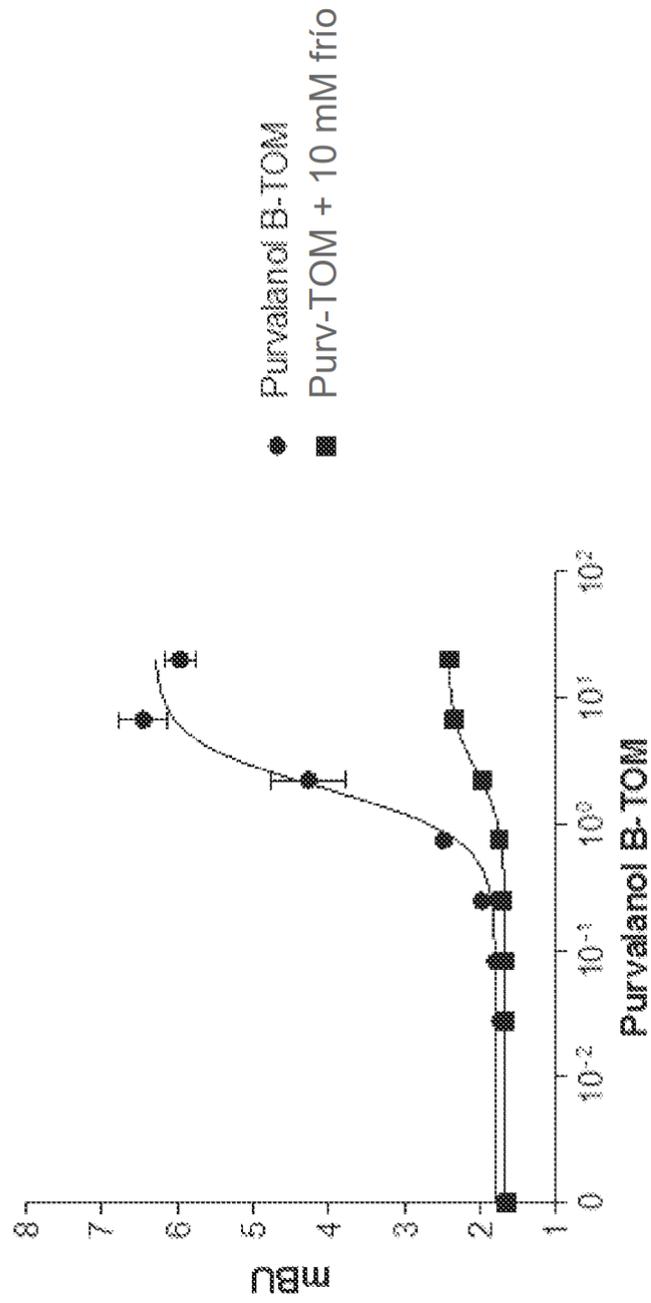


FIG. 19

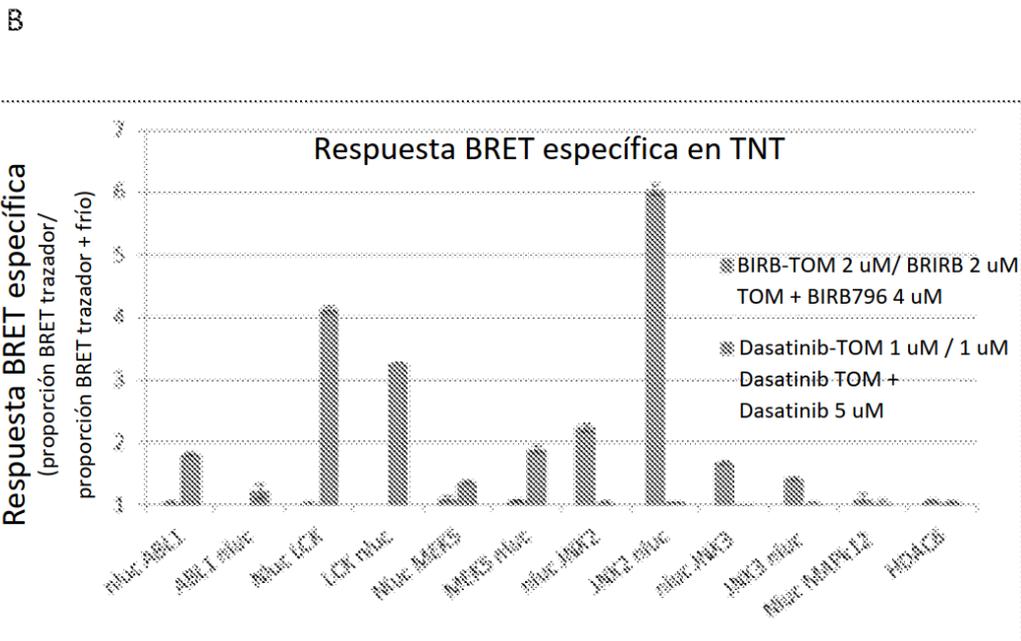
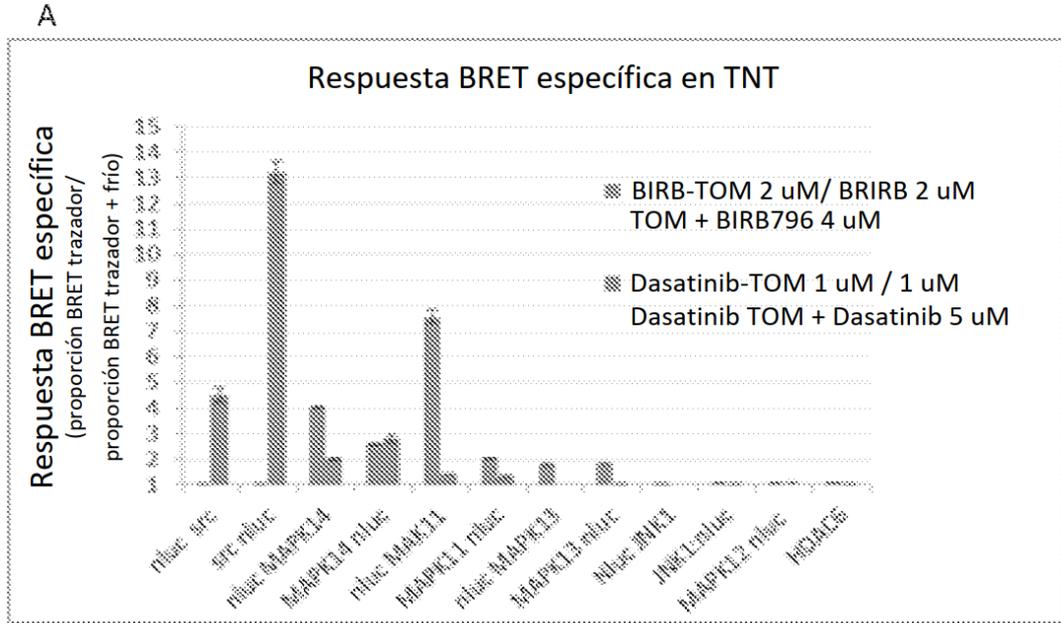
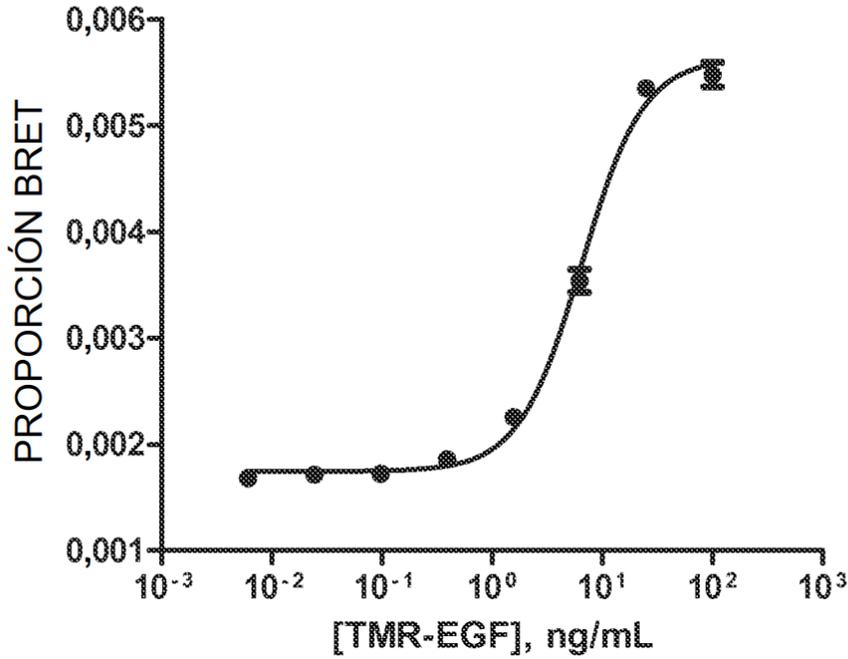


FIG. 20

Respuesta A la dosis del trazador de rojo EGF



Herceptina

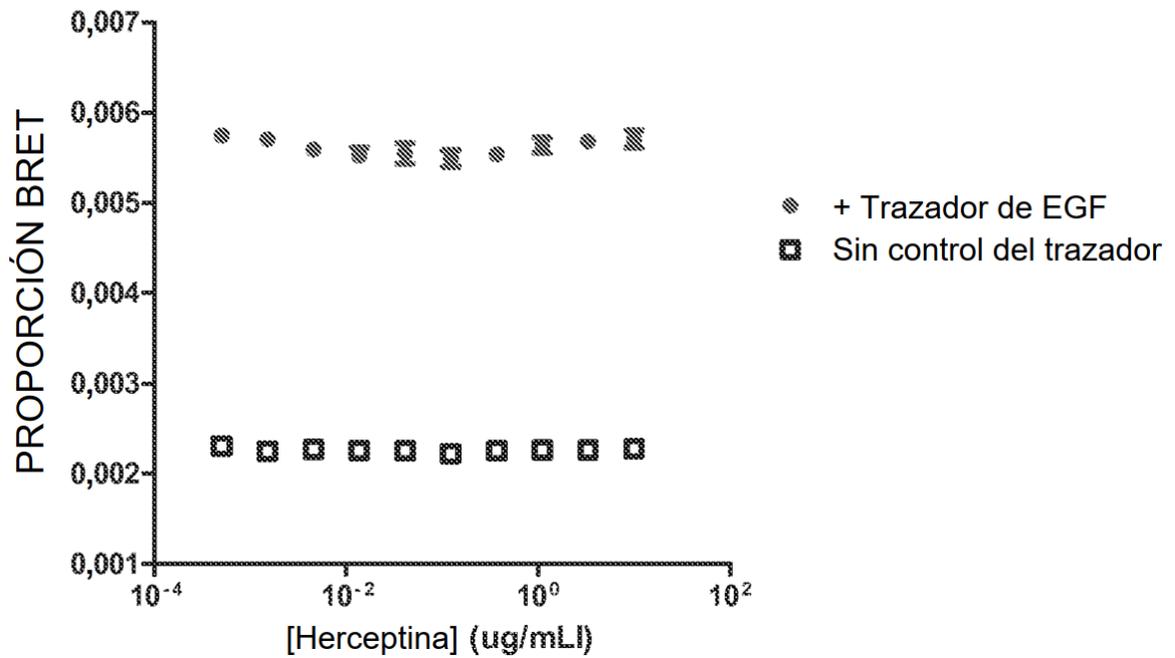


FIG. 20 (cont.)

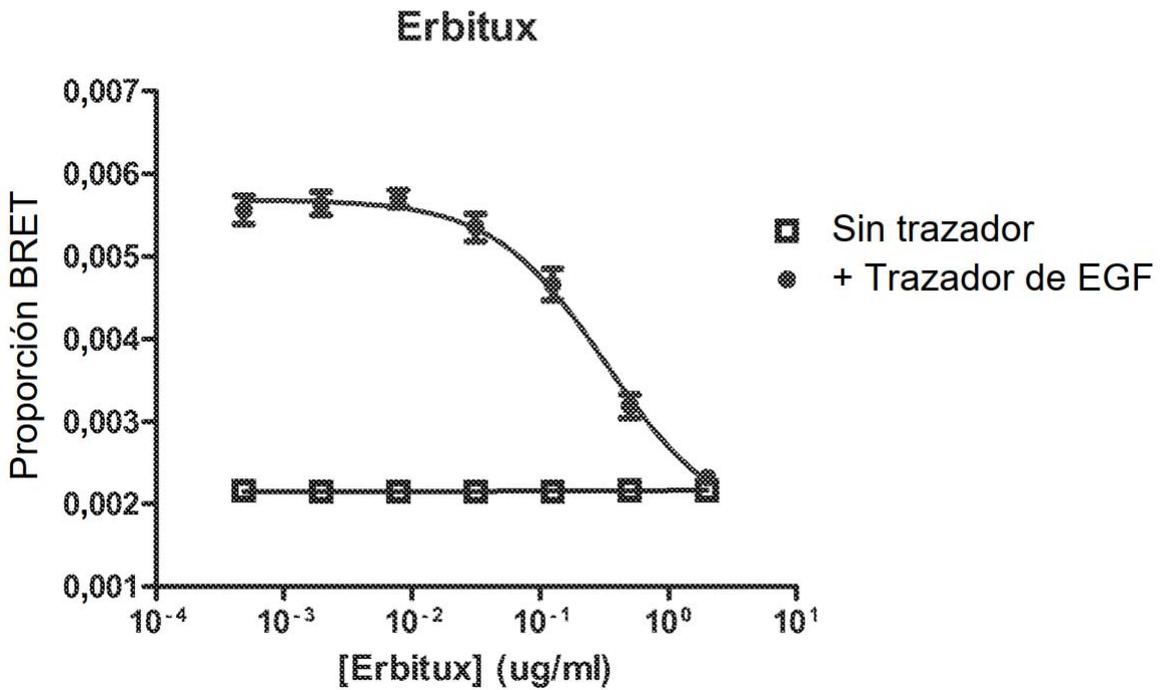
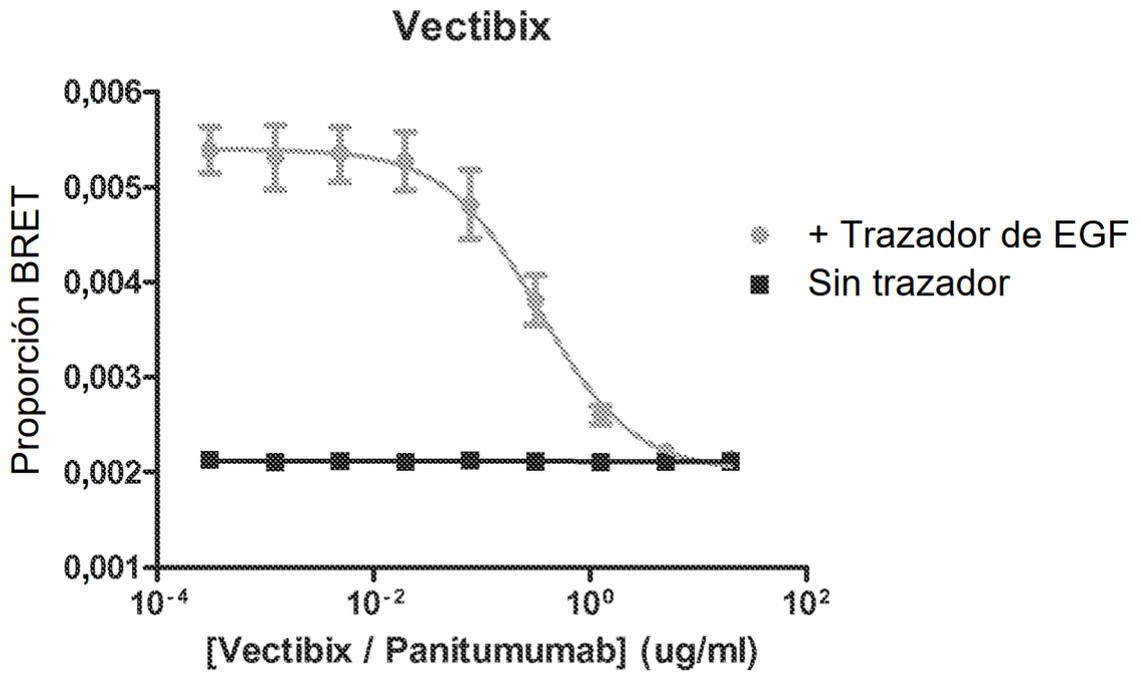


FIG. 21

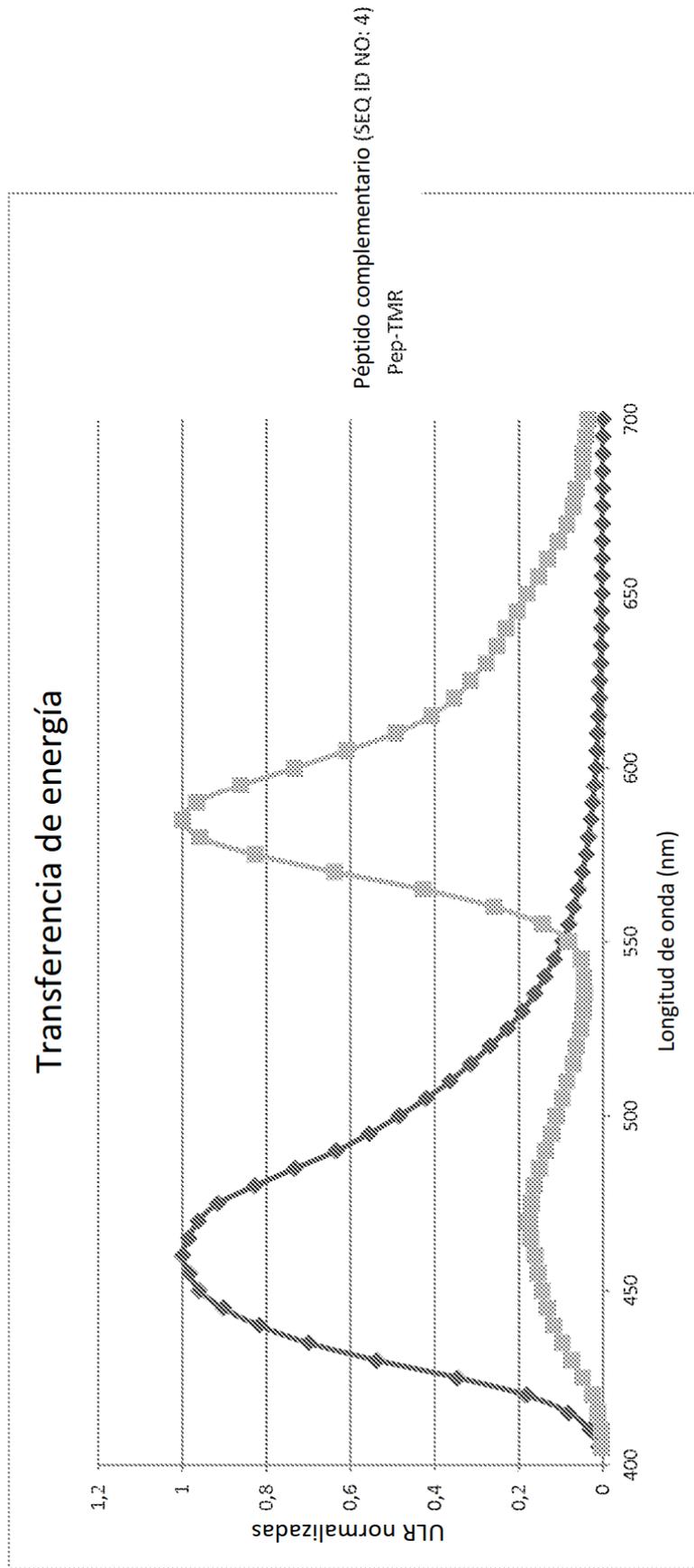
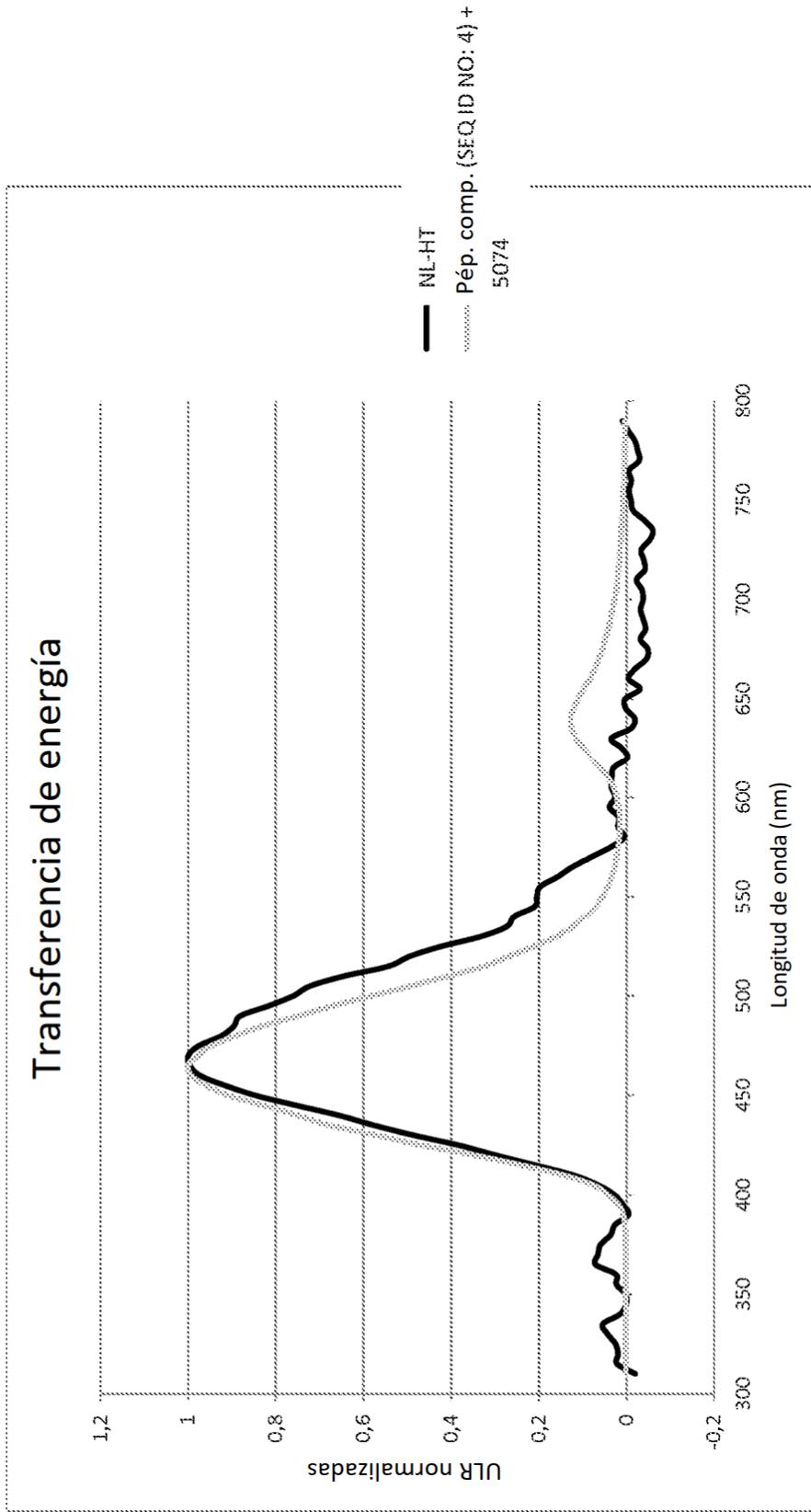


FIG. 22



5074 = NCT-DEVDGVTGWRLCERILA

FIG. 23

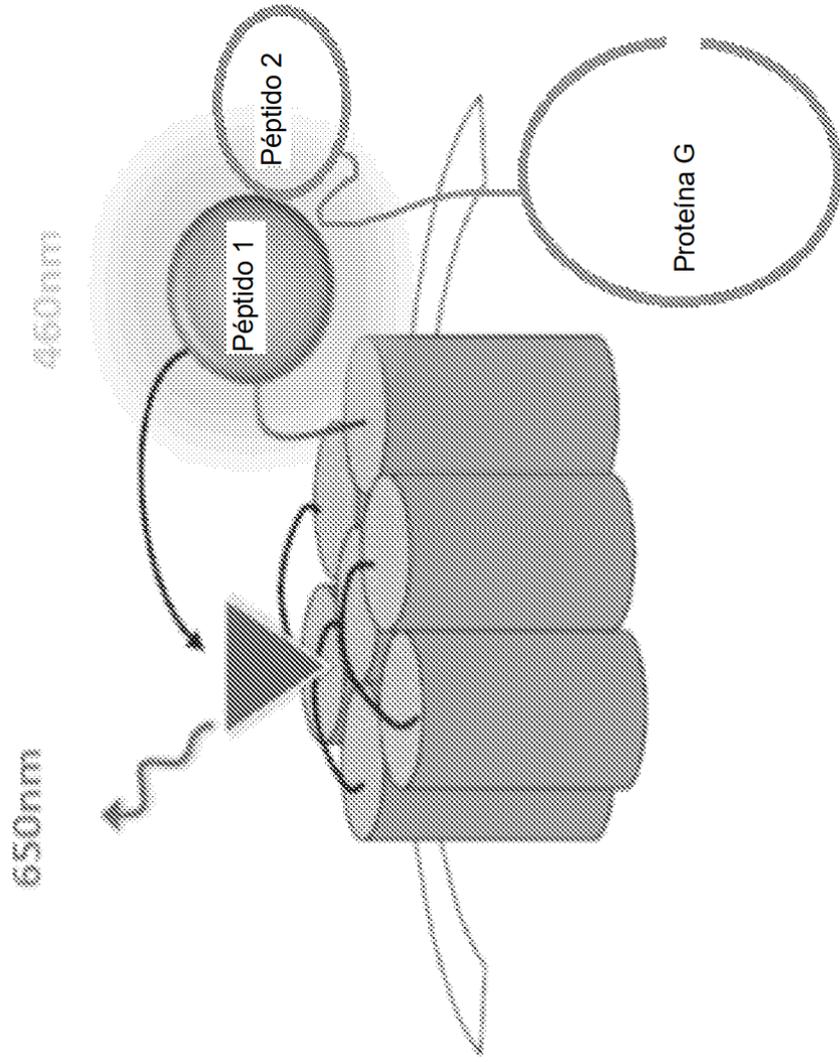
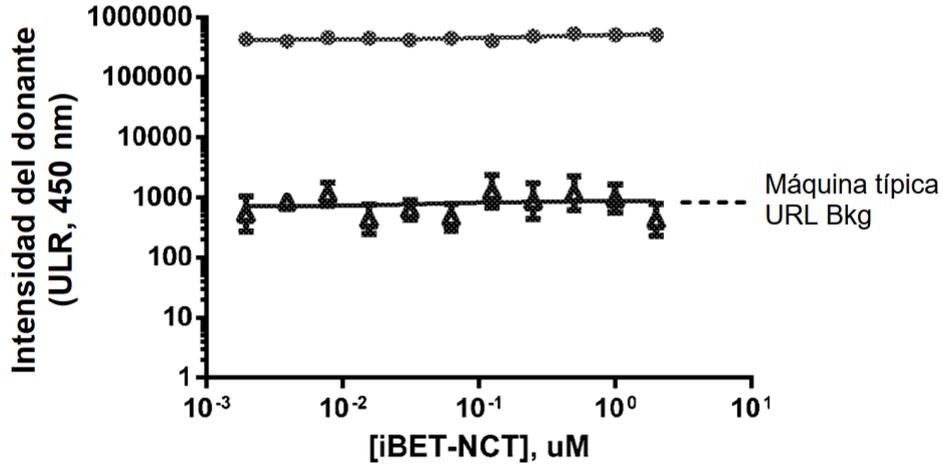


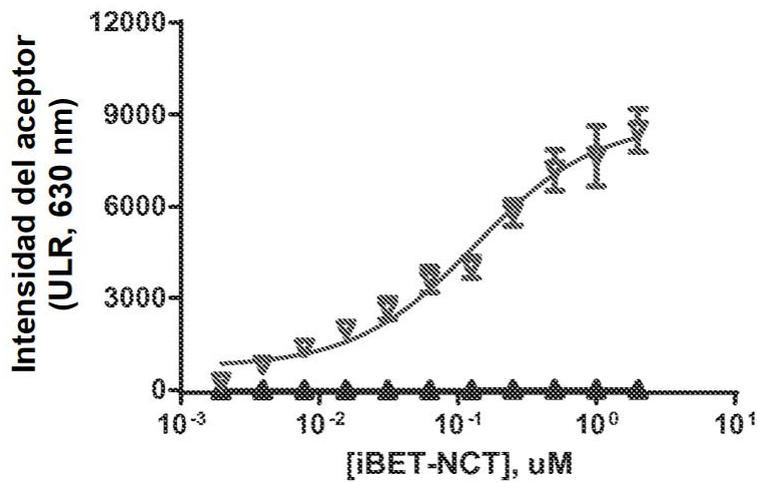
FIG. 24

11S-BRD4
Dilución de ADN a 1:10
PEP-80 1 uM frente a sin péptido control
50 ug/ml de Digitonina



- Trazador CRC, pep-80 1 uM
- ▲ Trazador CRC, sin péptido

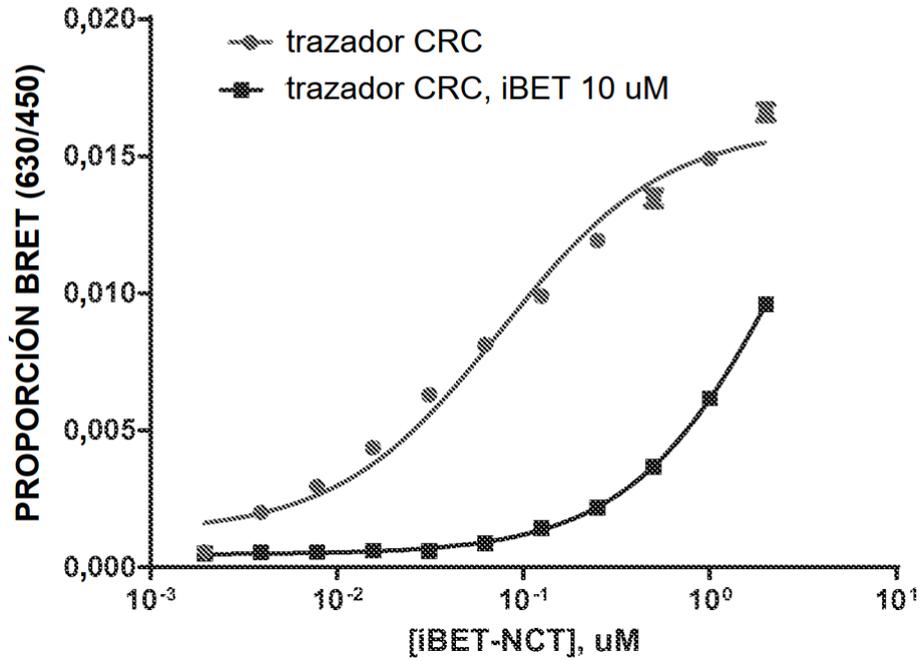
11S-BRD4
Dilución de ADN a 1:10
PEP-80 1 uM frente a sin péptido control
50 ug/ml de Digitonina



- ▲ Trazador CRC, pep-80 1 uM
- Trazador CRC, sin péptido

FIG. 25

11S-BRD4
Dilución de ADN a 1:10
PEP-80 1 μ M, 50 μ g/ml de Digitonina



11S-BRD4
Dilución de ADN a 1:10
Sin PEP-80 , 50 μ g/ml de Digitonina

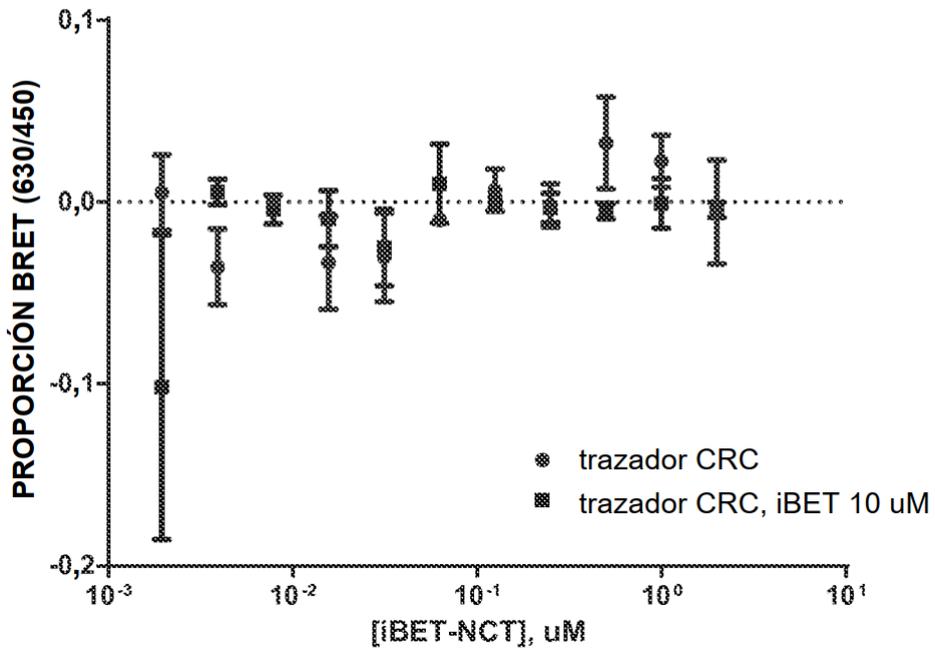


FIG. 26

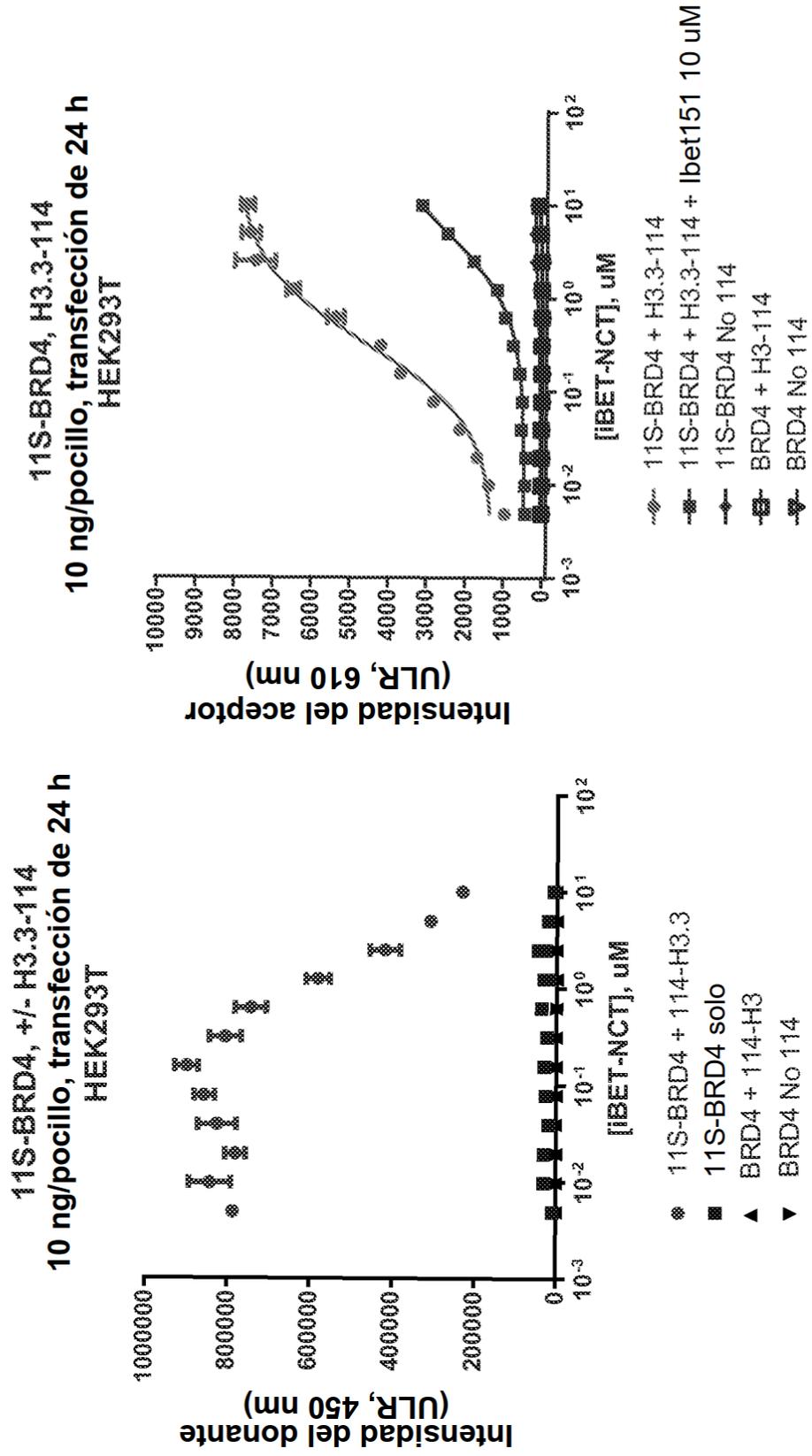
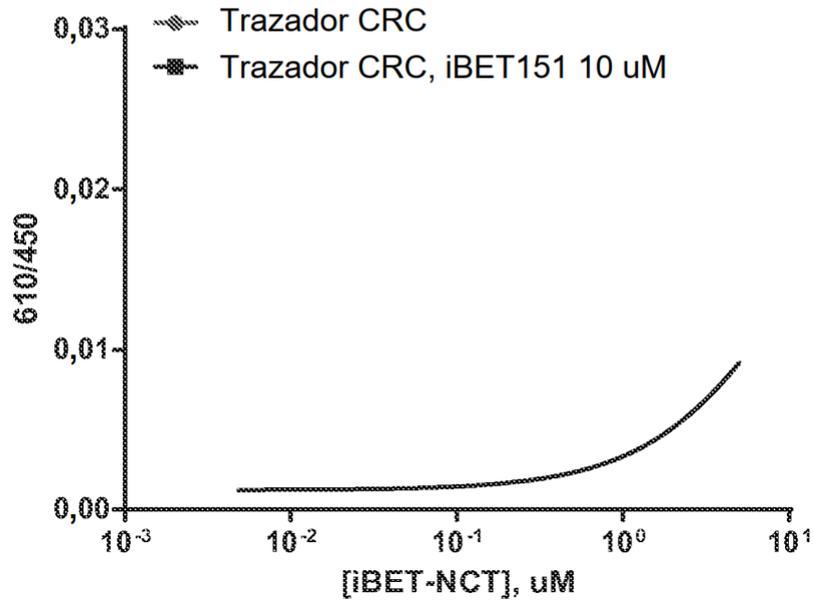


FIG. 27

11S-BRD4, H3.3-114
10 ng/pocillo, transfección de 24 h
HEK293T



11S-BRD4, No 114
10 ng/pocillo, transfección de 24 h
HEK293T

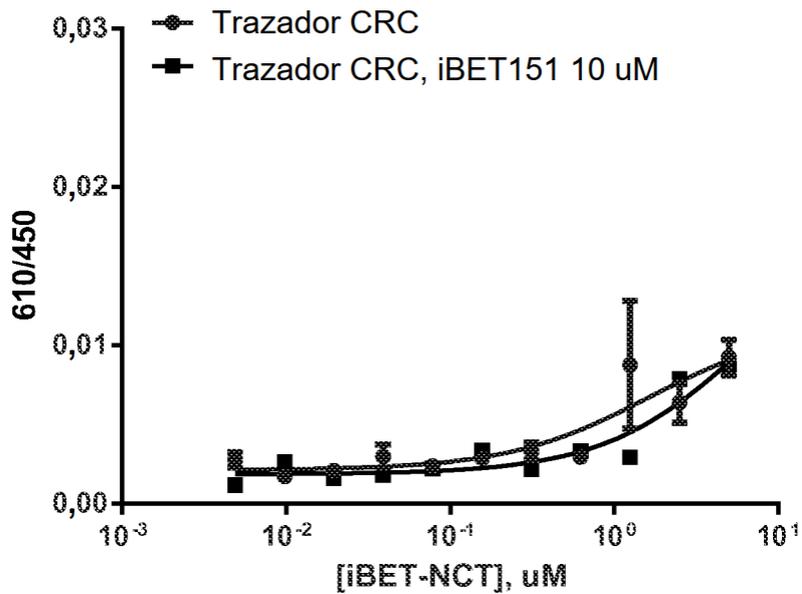
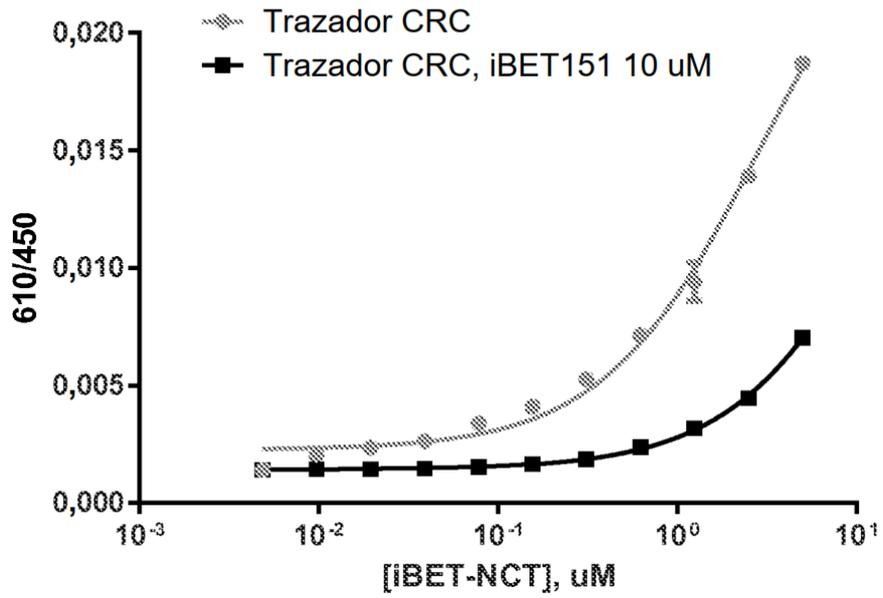


FIG. 27 (cont.)

NLuc-BRD4, H3.3-114
10 ng/pocillo, transfección de 24 h
HEK293T



NLuc-BRD4, No 114
10 ng/pocillo, transfección de 24 h
HEK293T

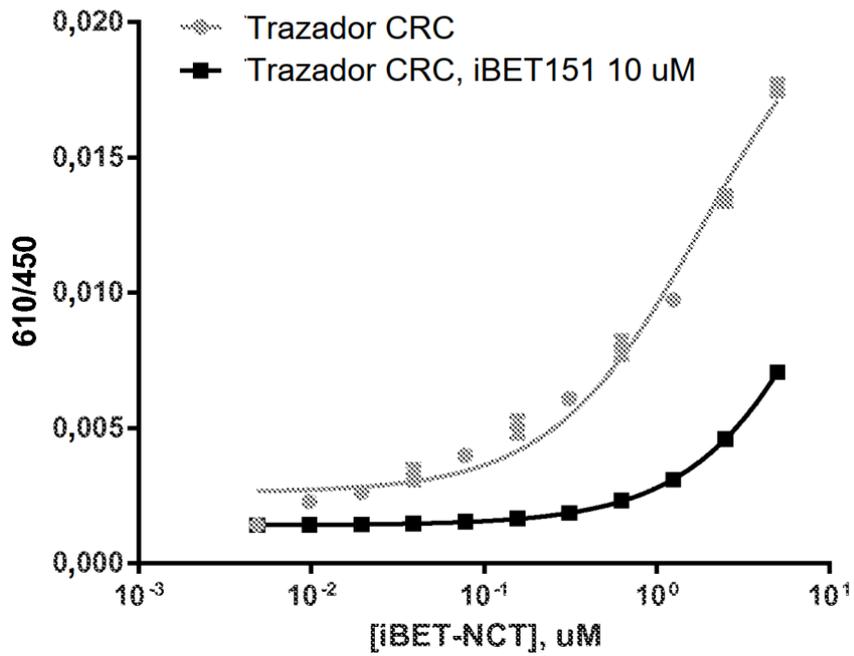


FIG. 28

11S-BRD4 / H3.3-114
10 ng/pocillo, transfección de 24 h
HEK293T
iBET NCT 2 uM constante

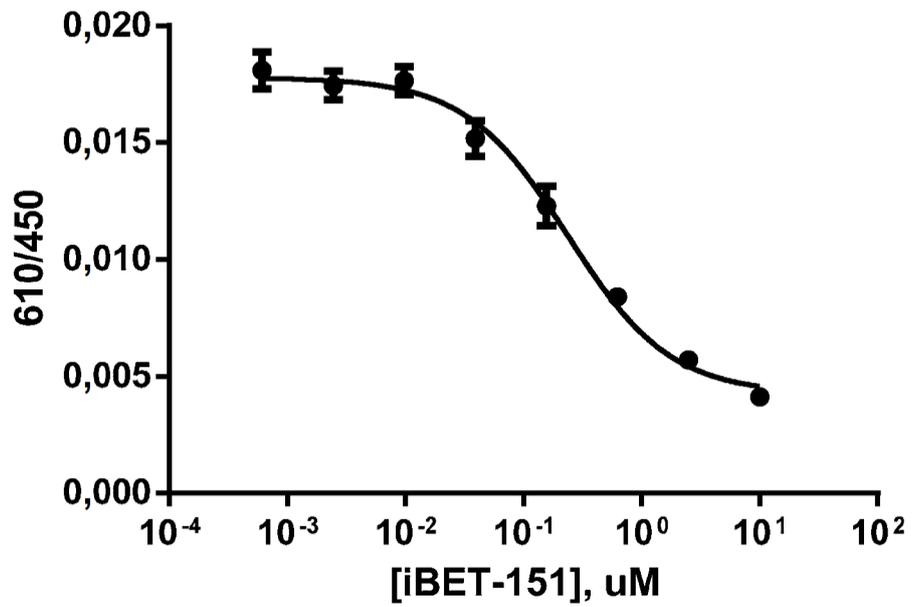


FIG. 29

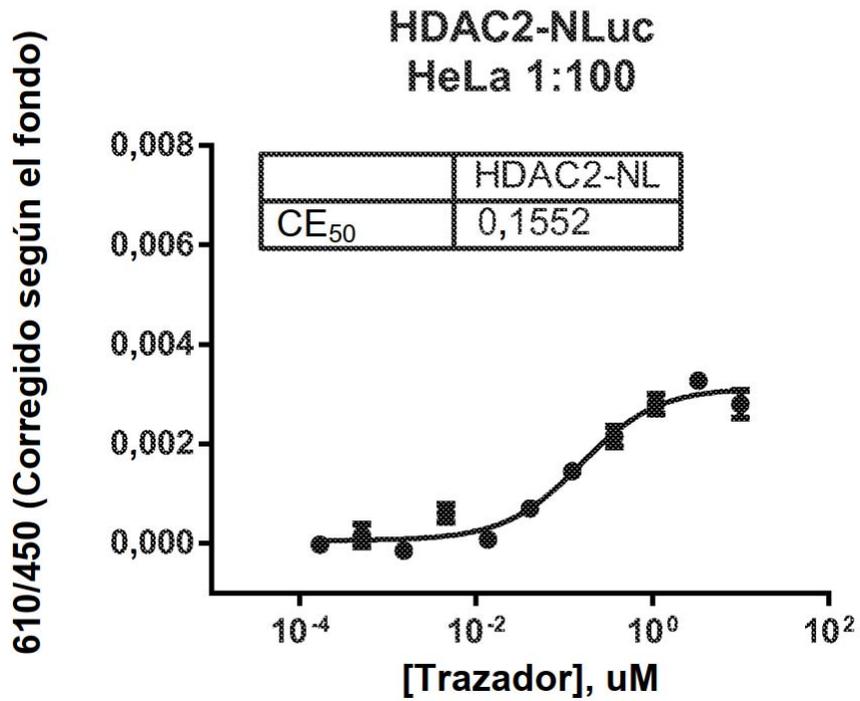
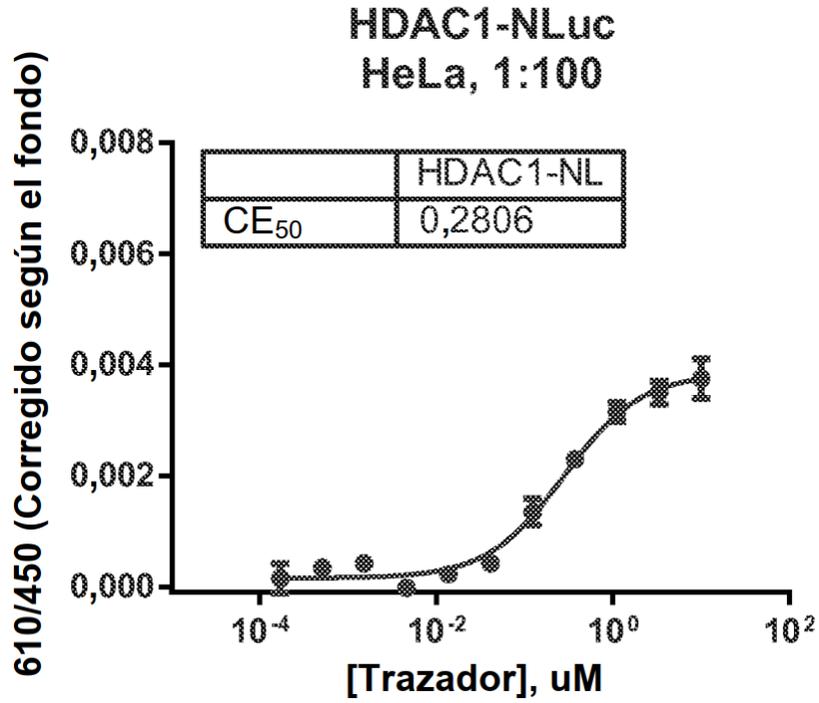


FIG. 29 (cont.)

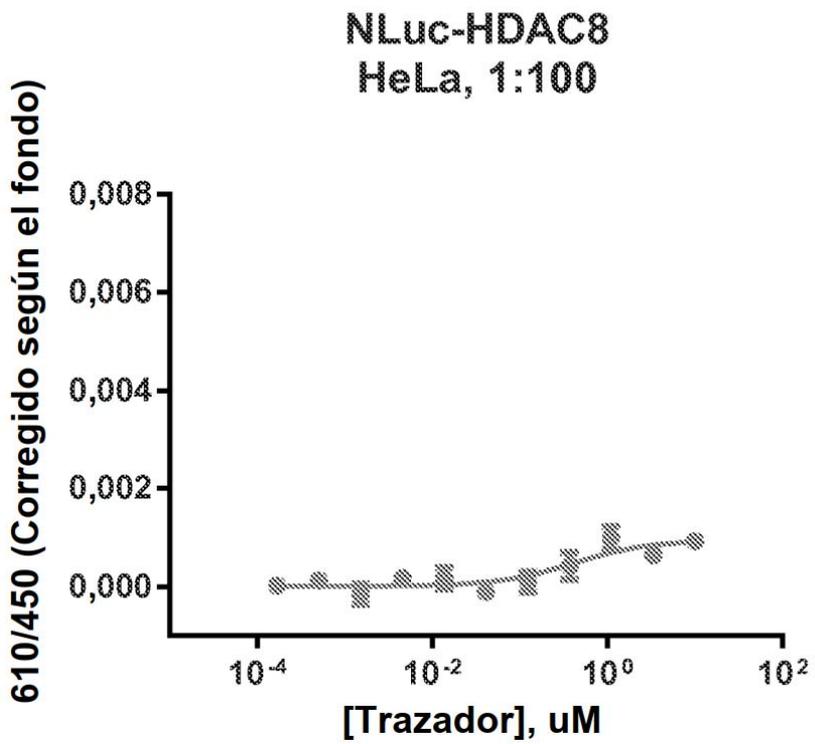
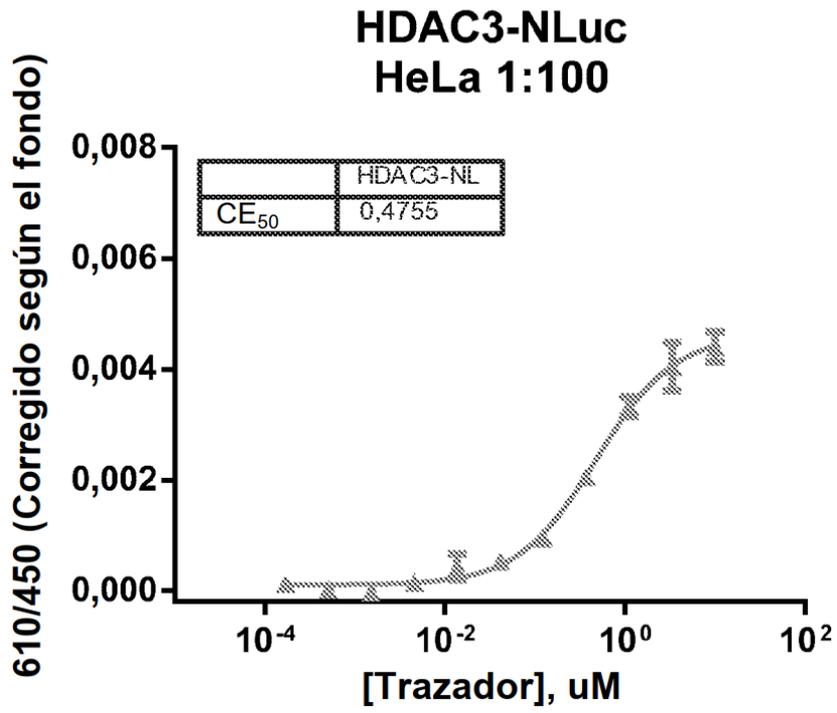


FIG. 30

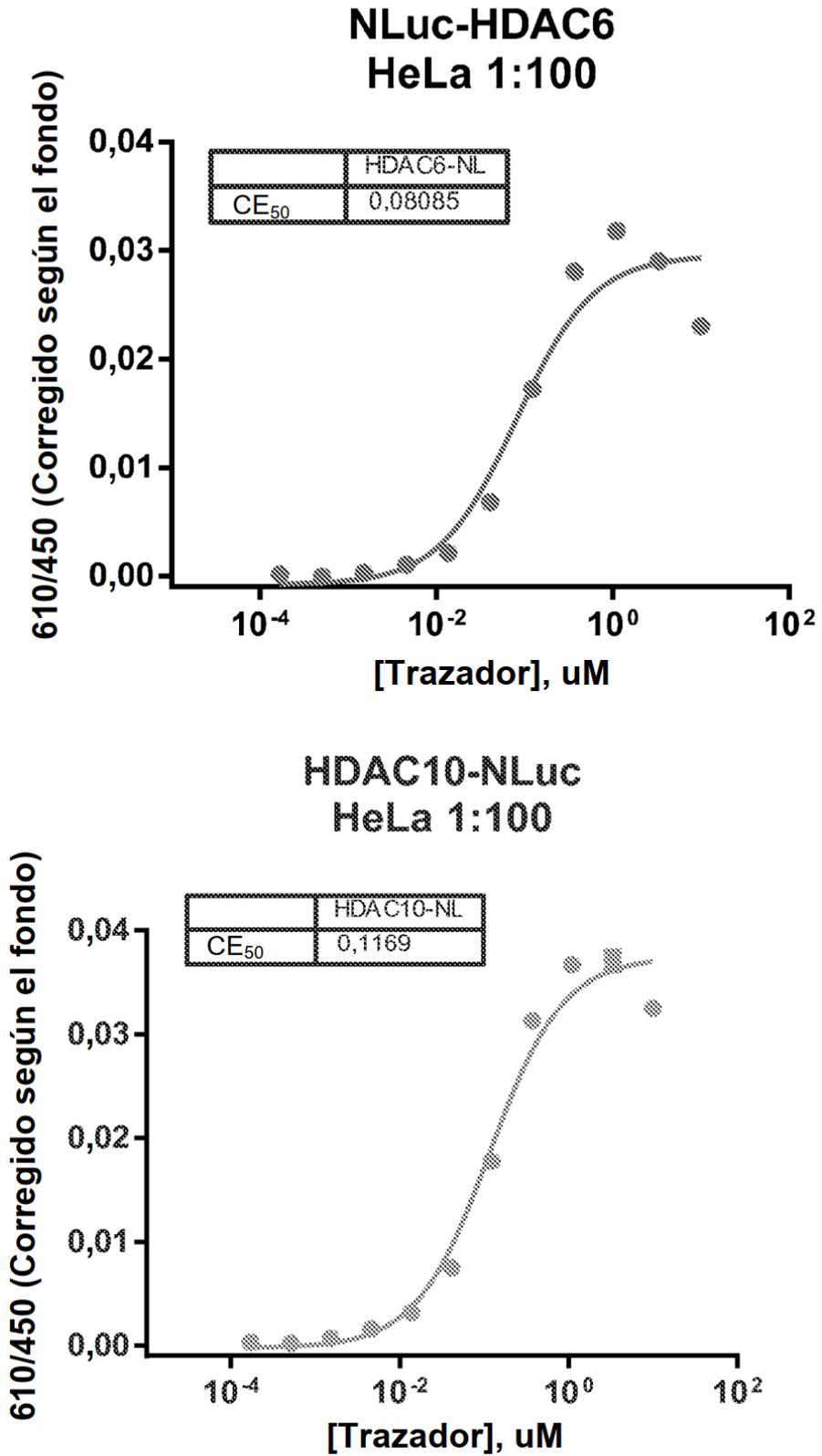


FIG. 30 (cont.)

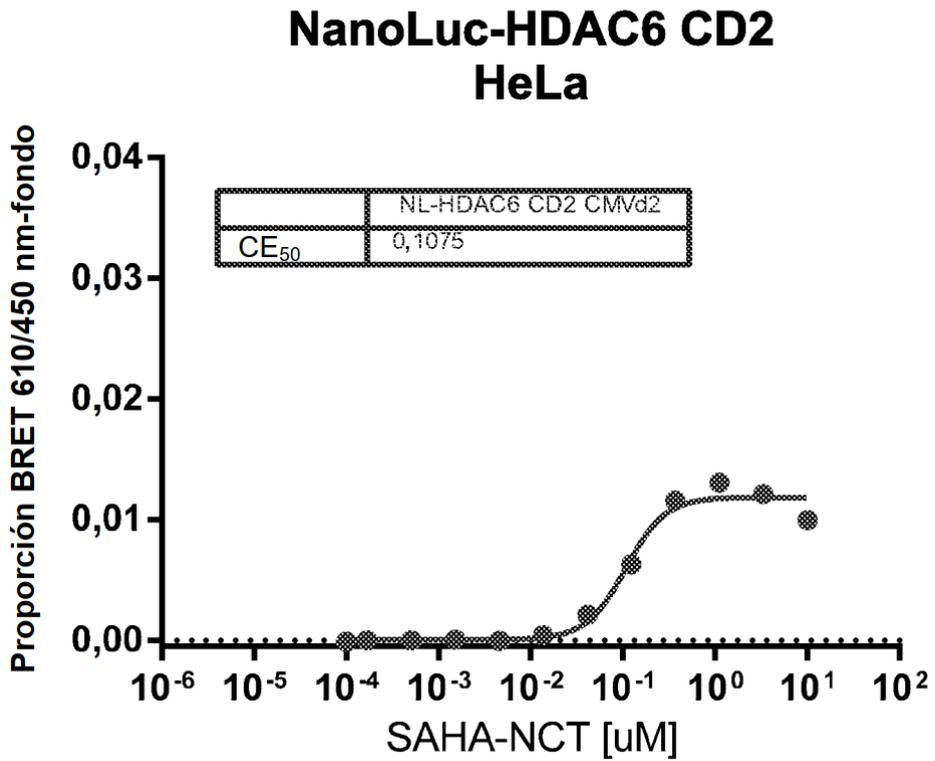
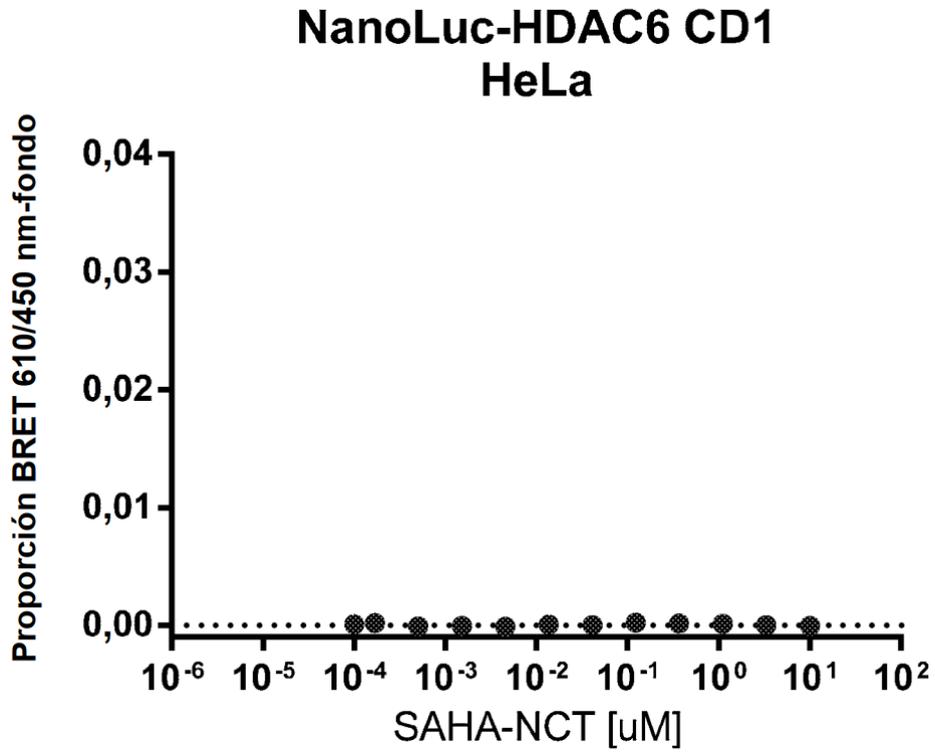


FIG.31

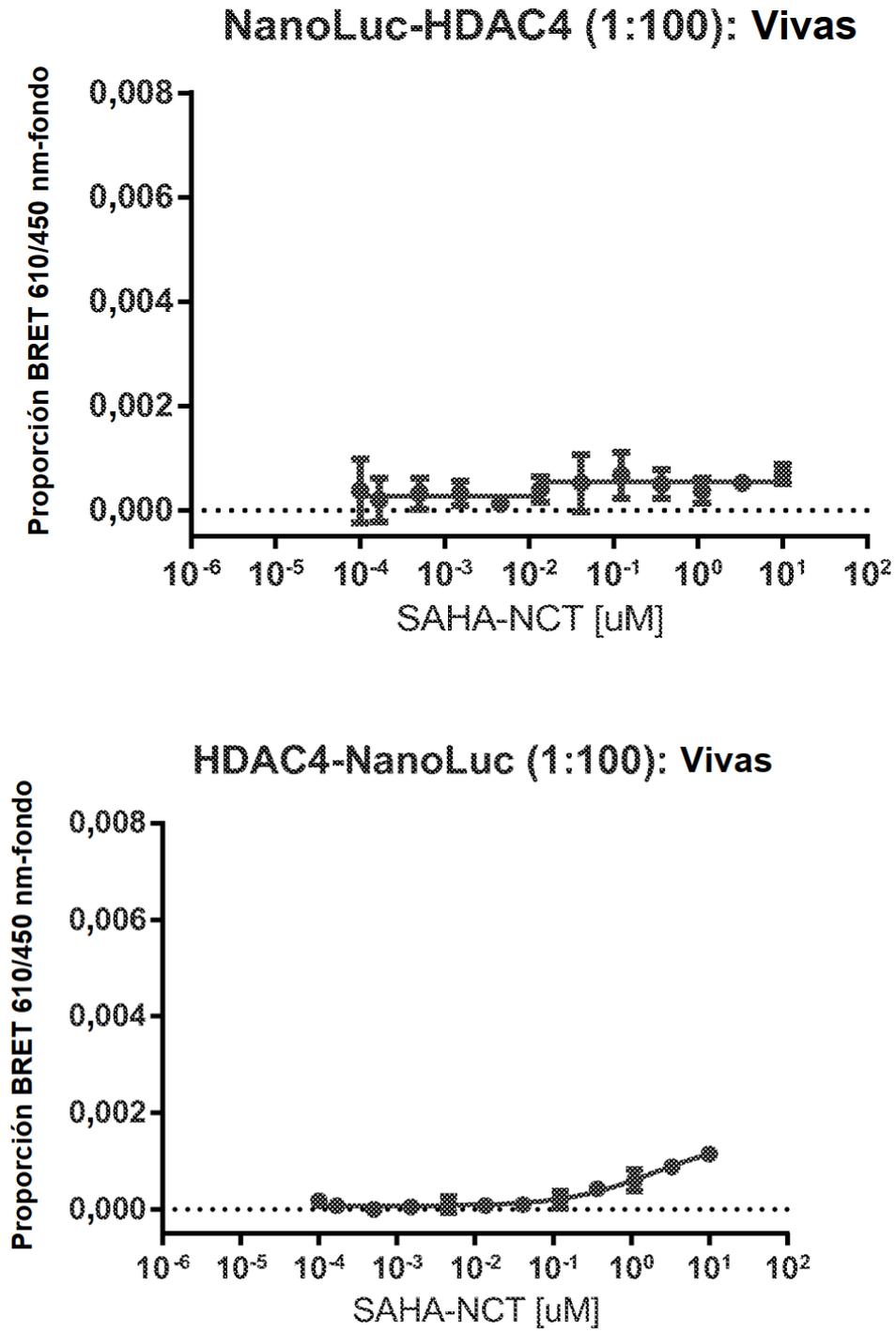
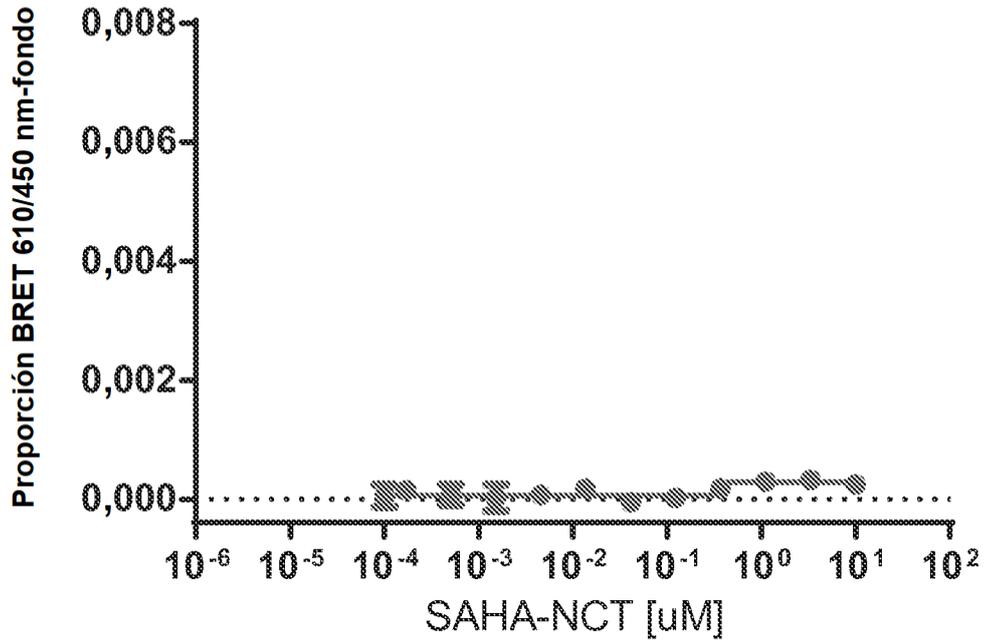


FIG.31 (cont.)

NanoLuc-HDAC5 (1:100): Vivas



HDAC5-NanoLuc (1:100): Vivas

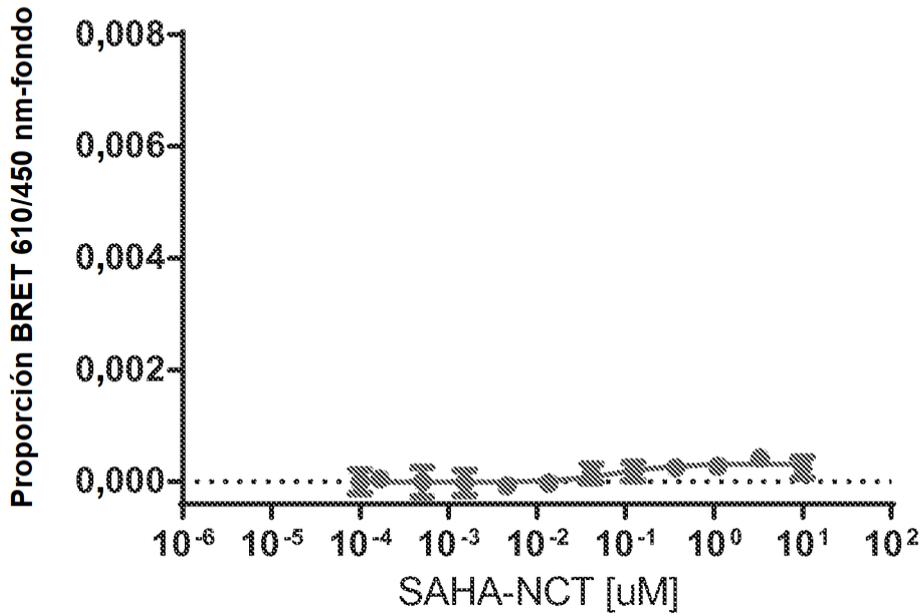
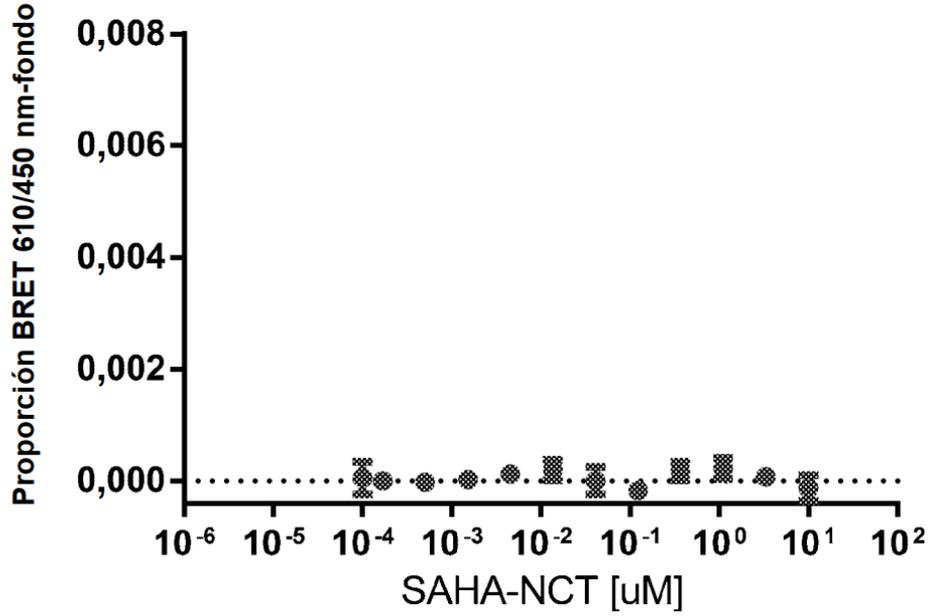


FIG.31 (cont.)

NanoLuc-HDAC9 (1:100): Vivas



HDAC9-NanoLuc (1:100): Vivas

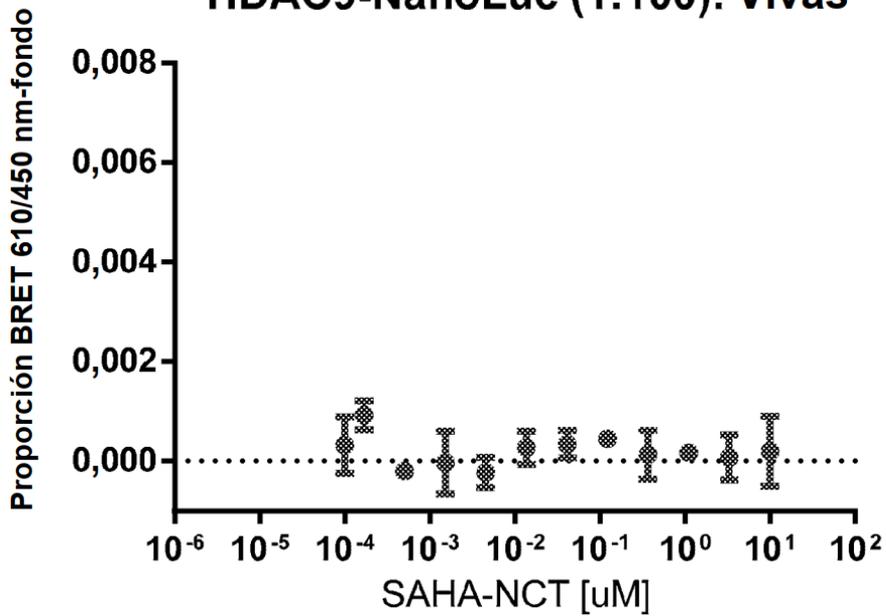


FIG.31 (cont.)

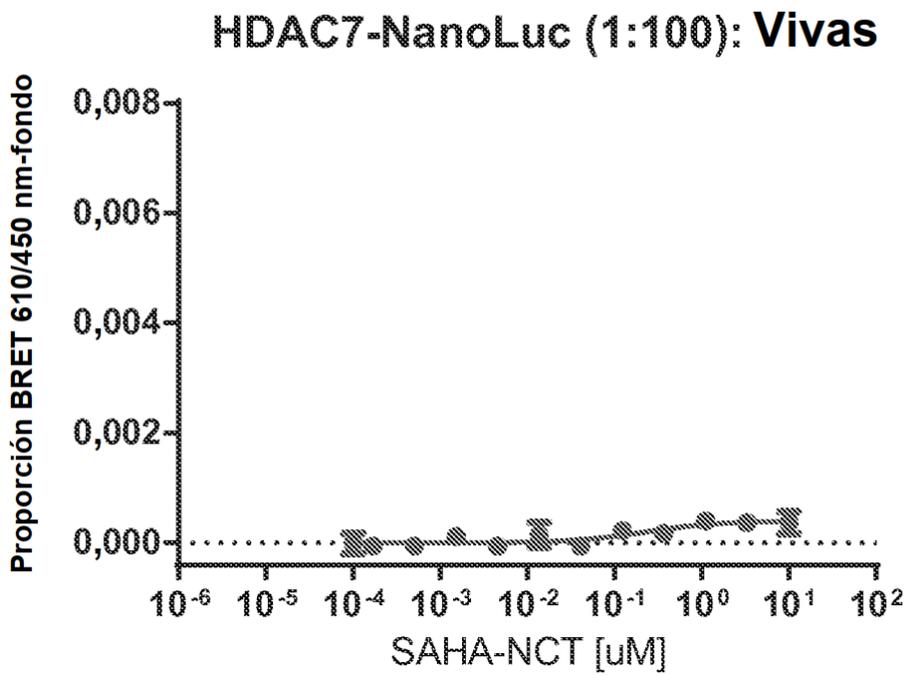
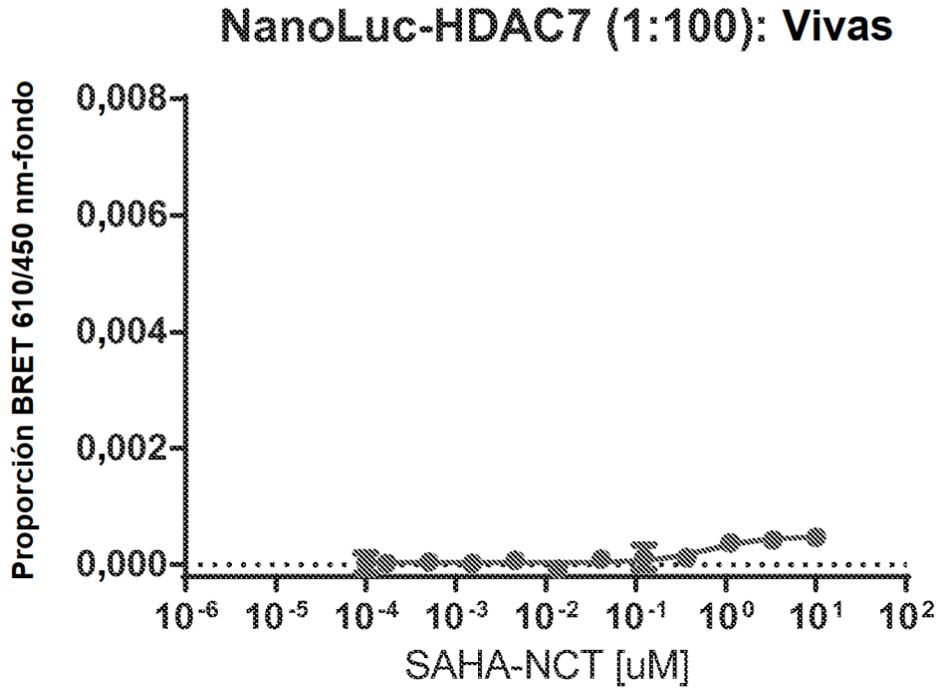
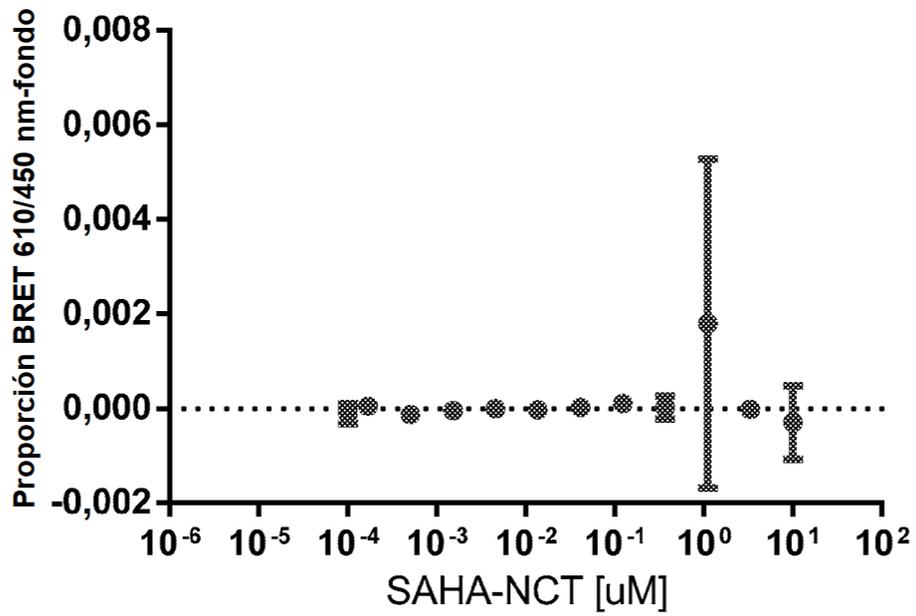


FIG.31 (cont.)

NanoLuc-HDAC11 (1:100): Live



HDAC11-NanoLuc (1:100): Live

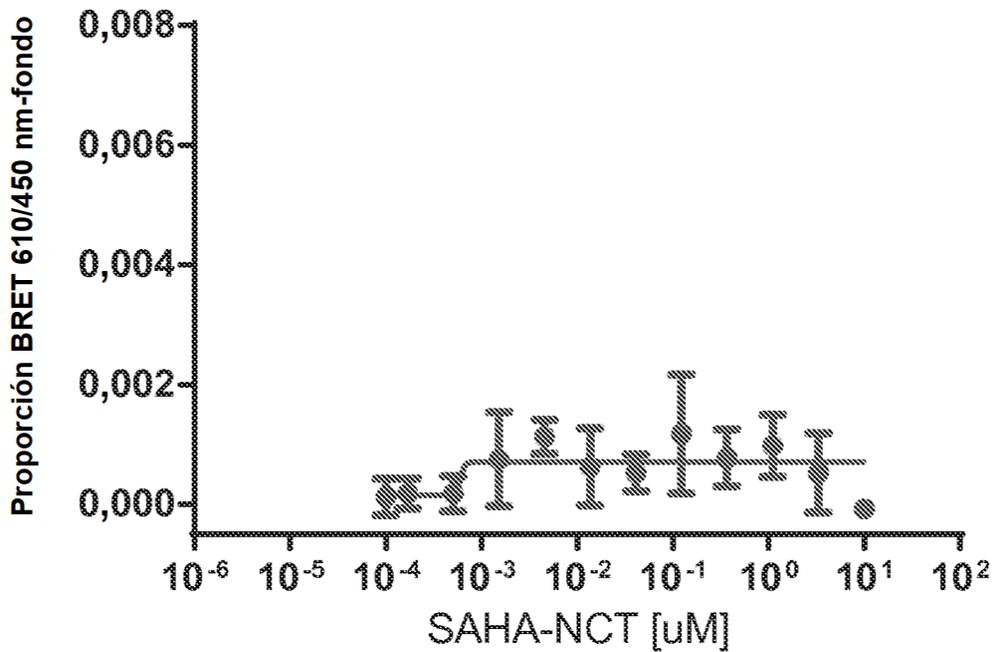
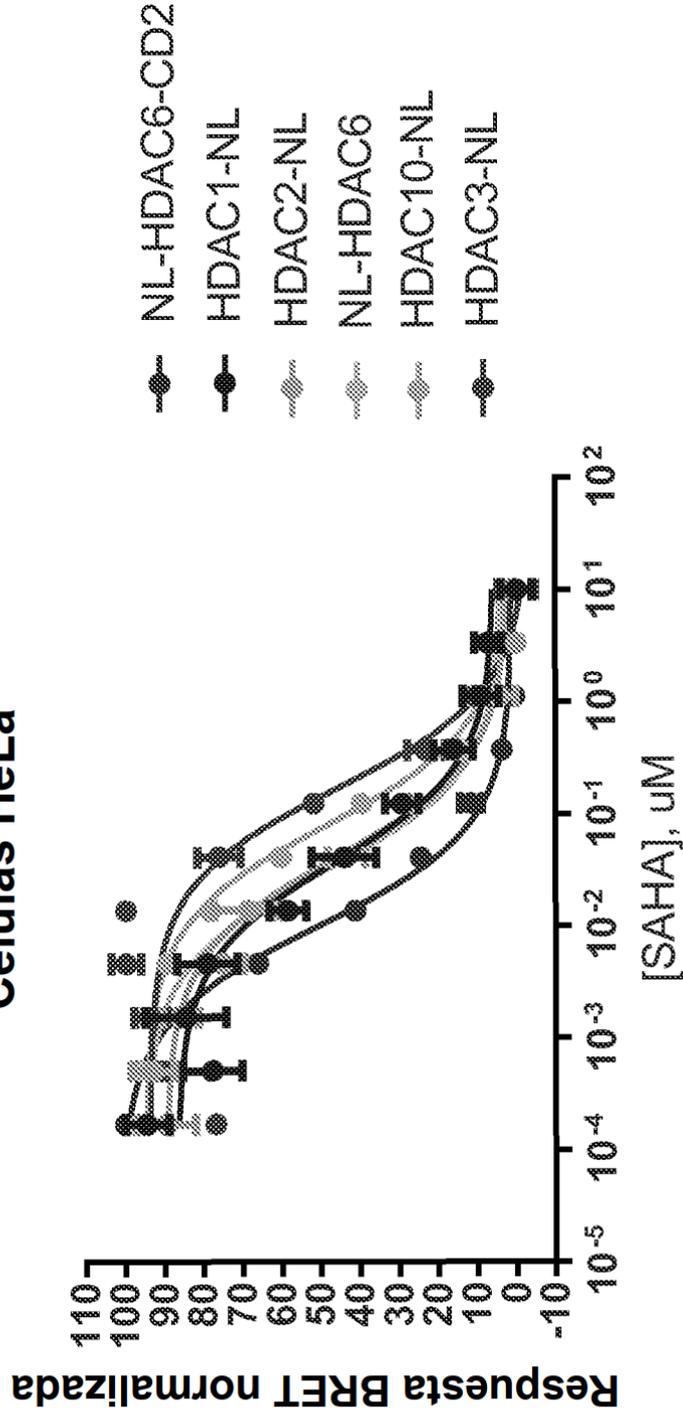


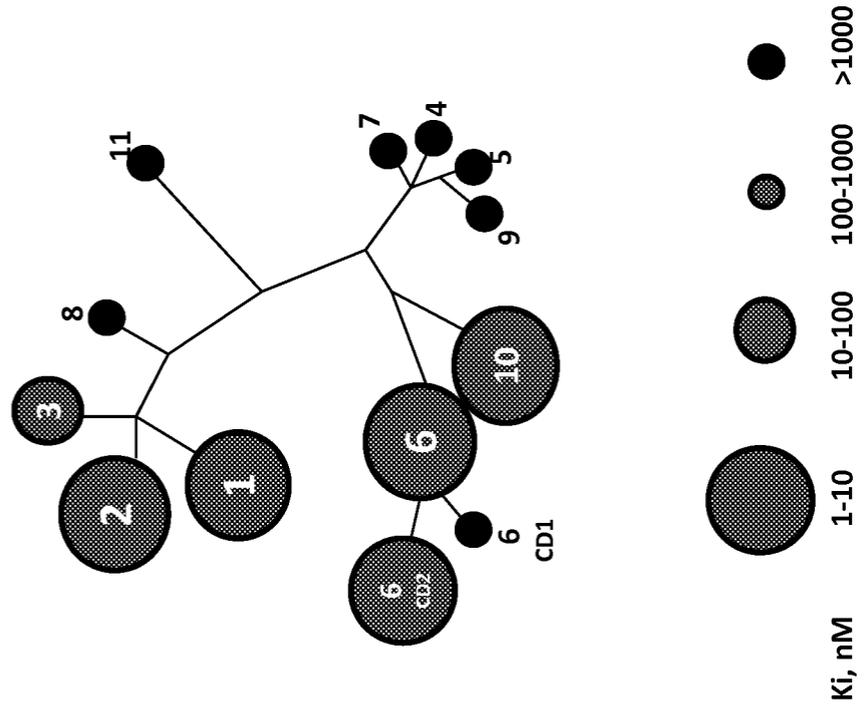
FIG. 32

SAHA IC50
Desplazamiento competitivo del trazador
Células HeLa



	HDAC1-NL	HDAC2-NL	HDAC3-NL	NL-HDAC6	HDAC10-NL	NL-HDAC6-CD2
IC ₅₀	0,03720	0,04126	0,1712	0,03075	0,07842	0,009810

FIG. 33



Isotipo	CF ₅₀ , nM, del trazador	Cl ₅₀ , nM	Ki, nM
HDAC1	280	37	8,1
HDAC2	160	41	5,7
HDAC3	480	170	55
HDAC6	80	31	2,3
HDAC10	120	78	8,3
HDAC6 CD2	100	10	1

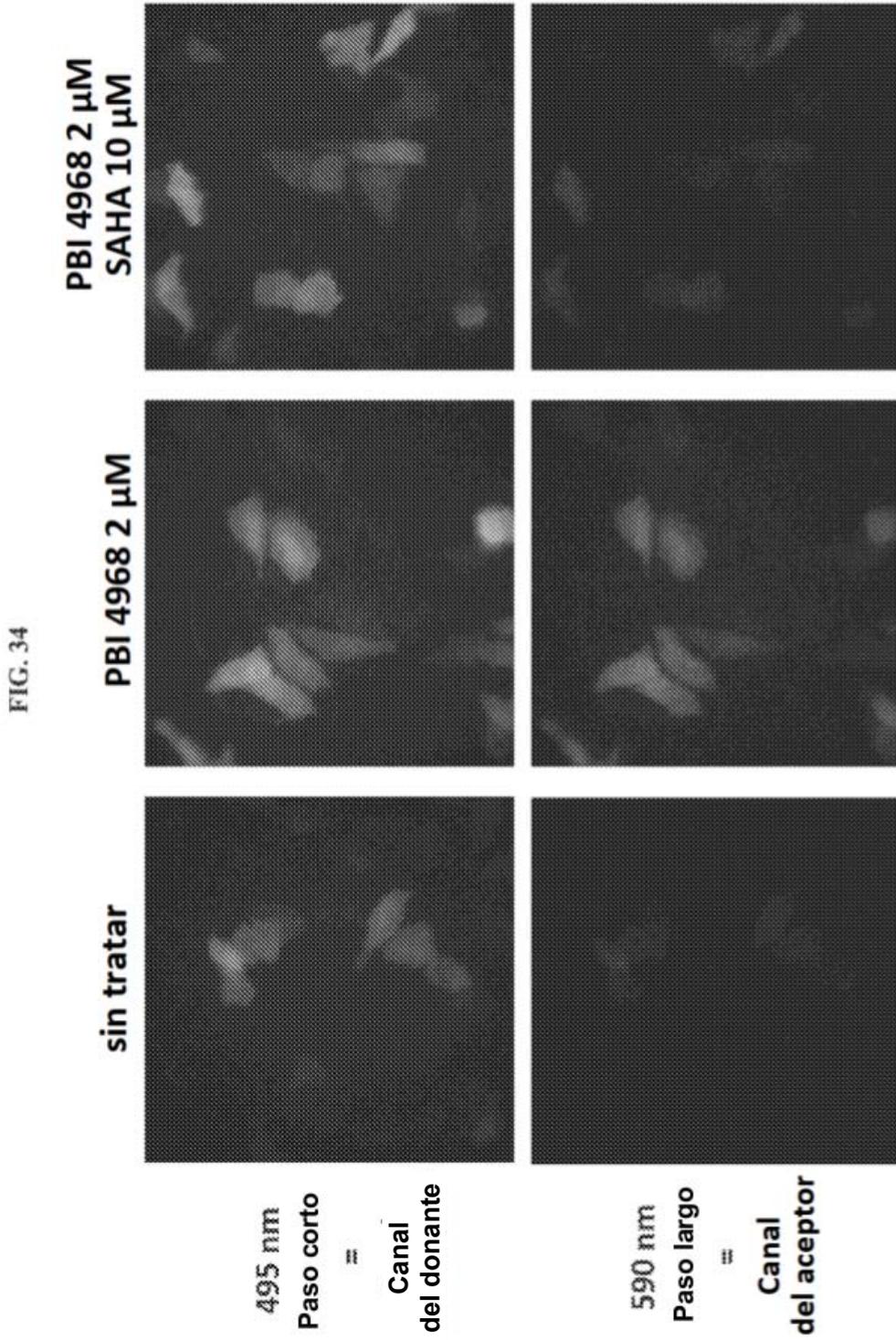


FIG. 35

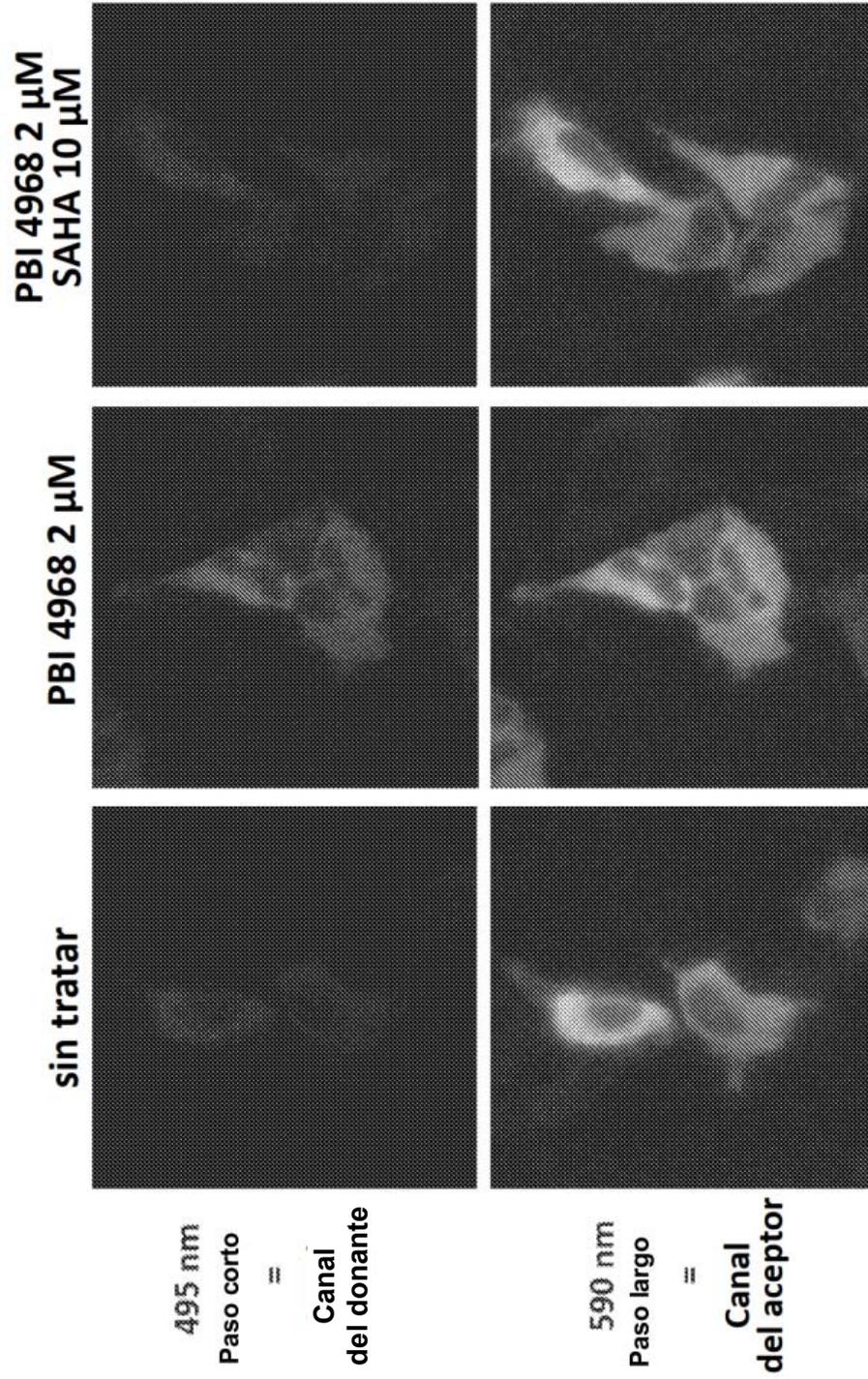
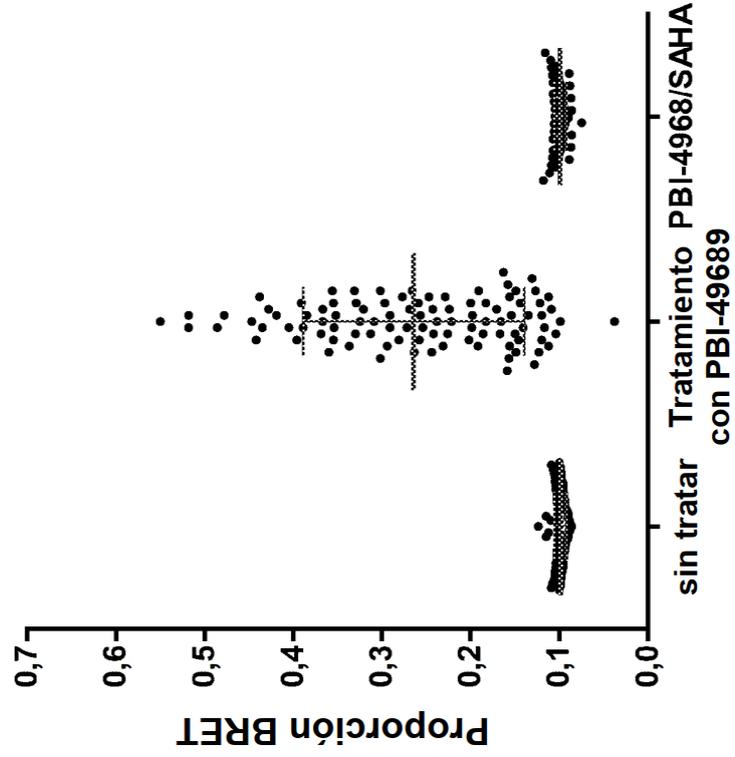


FIG. 36

Experimento de unión a HDAC10/SAHA



Experimento de unión a HDAC6/SAHA

