Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

00 25248

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00025248 00000000 Folios: 57
Fecha (AMD): 2000-04-06 17:27:06
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social: **ABBOTT LABORATORIES** sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América

No. de Identificación:

Representante Legal (Persona Jurídica): JOSE ANTONIO LLOREDA

País de Domicilio: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Departamento o Estado: ILLINOIS

Dirección: 100 Abbott Park Road Abbott Park, Illinois 60064-6050 Estados Unidos de América.

Ciudad: ABBOTT PARK Teléfono 009 1 847 938 3490

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre: JOSE ANTONIO LLOREDA

Dirección y Domicilio: Calle 72 No. 5-83 Piso 6°

Ciudad: Santafé de Bogotá Teléfono 326 42 70

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es): Steven W. Fesik y Philip J. Hajduk

Identificación: 1099 Portsmouth Circle, Gurnee, IL 60031, y 258 Lenox Lane Mundelein,

Dirección: IL 60060, Todos residentes en Estados Unidos de América.

Ciudad: Gurnee y Mundelein. Teléfono 009 1 847 938 3490

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención: **USO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C PARA DETECTAR EL LIGAMIENTO A MOLÉCULAS OBJETIVO**

PRIORIDAD REIVINDICADA SI [X] NO [ ] **TIPO DE PRIORIDAD** **ANDINA** [ ] **UNIONISTA** [X]

(33) País US (32) Fecha 09-04-99 (31)No. Solicitud 09/288.924

Para Publicar a los [ ] **6 meses** [ ] **12 meses** [ ] **18 meses a partir de la fecha de la presente Solicitud**

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL A. 61

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para detectar el ligamiento de un ligando putativo a una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C, métodos de investigación de la presencia de compuestos que se liguen a una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C, métodos para calcular la constante de disociación de un compuesto ligando que se ligue a una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C, y métodos empleados para la determinación de los aminoácidos específicos en una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C afectada por el ligamiento de un ligando. La presente invención proporciona también compuestos identificados por los métodos de investigación de la presencia de compuestos arriba mencionados.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☐
Los poderes debidamente otorgados, o mensión de su protocolización ante la S.I.C. 11.700	☒
Recibo de la tasa respectiva **$608.000,00**	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia dela primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción Simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☒
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms. Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐
Nota: Anexo información sobre la fuente normativa de reciprocidad y petición Reconocimiento Personería	☒

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCIÓN Y DECLARO QUE LA INVENCIÓN ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE JOSE ANTONIO LLOREDA C.C. 17.159.681 de Bogotá TP No. 10.784

2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00025248 00000000 Folios: 57
Fecha (AMD): 2000-04-06 17:27:06
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 19,987
FECHA : MARZO 27 DE 2000

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	1000341	7,446,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL : $	608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

ANEXO

Atentamente manifiesto a usted que la fuente normativa de la reciprocidad de la cual se deriva el derecho del solicitante para reivindicar prioridad en el presente caso, se encuentra:

a) En el Artículo 2 del Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la "Organización Mundial de Comercio (OMC)" suscrito en Marruecos el 15 de abril de 1994. Este acuerdo fue aprobado por el Congreso de Colombia mediante Ley 170 de 1994 y por la Corte Constitucional Colombiana mediante Sentencia C-137-95 de 28 de marzo de 1995, y entró en vigencia en nuestro país el 30 de abril de 1995, 30 días después de su ratificación.

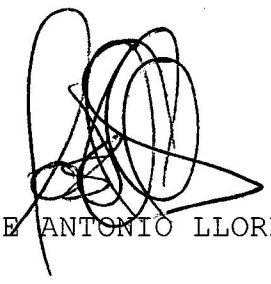
   Dicho Artículo establece que en lo que respecta a las partes II, III y IV del Acuerdo (referidas a la existencia, alcance y ejercicio de los derechos de propiedad intelectual, entre otros) los Miembros cumplirán los artículos 1 a 12 y el Artículo 19 del Convenio de París --el Artículo que establece la prioridad de las patentes de invención es el Artículo 4--

b) En el Artículo 4 del mencionado Anexo 1C, Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual relacionados con el Comercio, del Acuerdo por el cual se establece la Organización Mundial de Comercio (OMC), el cual consagra el "Trato de la nación más favorecida" para los países Miembros del mismo.

c) En el Artículo 4 del Convenio de París, del cual ya era parte Colombia en el momento en que se presentó la solicitud **cuya prioridad ahora reivindico**, con lo cual se cumple la reciprocidad exigida en el Artículo 12 de la Decisión 344 del Acuerdo de Cartagena para con solicitudes provenientes de los Países Miembros del Acuerdo de Cartagena.

ANEXO

El documento que acredita la calidad REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se encuentra protocolizado ante esa División bajo el No. 11.700. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



JOSE ANTONIO LLOREDA

T.P. No. 10.784

CODIGO 231

RESUMEN -OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

USO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C PARA DETECTAR EL LIGAMIENTO A MOLÉCULAS OBJETIVO

La presente invención proporciona métodos para detectar el ligamiento de un ligando putativo a una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C, métodos de investigación de la presencia de compuestos que se liguen a una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C, métodos para calcular la constante de disociación de un compuesto ligando que se ligue a una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C, y métodos empleados para la determinación de los aminoácidos específicos en una molécula objetivo enriquecida con ^{13}C afectada por el ligamiento de un ligando. La presente invención proporciona también compuestos identificados por los métodos de investigación de la presencia de compuestos arriba mencionados.

Abbott Laboratories
Caso: 5816.CO.02

Uso de la Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C para Detectar el Ligamiento a Moléculas Objetivo

Campo de la Invención

La presente invención se refiere al uso de la resonancia magnética nuclear para detectar el ligamiento entre compuestos y moléculas objetivo enriquecidas con el isótopo ^{13}C.

Referencia Cruzada con Solicitudes Relacionadas

La presente solicitud de patente es una continuación, en parte, de la solicitud No. de Serie 09 241 194, radicada en Febrero 1, 1999, la cual es a su vez una continuación de la solicitud No. de Serie. 08/744 701, radicada en Octubre 31, 1996, ahora Patente de los Estados Unidos No. 5, --- ---, la cual es una continuación en parte de la solicitud No. de Serie 08/678 903, radicada en Julio 12, 1996, ahora abandonada, la cual es una continuación en parte de la solicitud No. de Serie 08/558 633, radicada en Noviembre 14, 1995, en la actualidad, Patente de los Estados Unidos No. 5 --- ---.

Antecedentes de la Invención

Una de las herramientas más poderosas en el descubrimiento de nuevos prospectos de drogas es el tamizare (investigación) aleatorio de librerías de productos naturales y sintéticos a fin de descubrir compuestos que se liguen a una molécula objetivo en particular (por ejemplo, la identificación de ligandos de esa molécula objetivo). Usando este método, los ligandos pueden identificarse por su capacidad para formar una asociación física con una molécula objetivo o por su capacidad para alterar una función de una molécula objetivo.

En el momento de investigar un ligamiento físico, una molécula objetivo típicamente se expondrá a uno o más compuestos de los cuales se sospeche son ligandos y se realizarán ensayos para determinar sí se forman complejos entre la molécula objetivo y uno o más de aquellos compuestos. Tales ensayos, como es bien conocido en este campo de la industria, analizan la presencia de cambios groseros –burdos- en la molécula objetivo (por ejemplo, cambios en el tamaño, carga, movilidad) que indiquen la formación de complejos.

En aquellos casos en donde se pueden medir los cambios, las condiciones del ensayo se establecen de modo que permitan la medición de un evento biológico o químico relacionado con la molécula objetivo (por ejemplo, una reacción catalizada por una enzima, la activación de una enzima mediada por receptores, y similares). A fin de identificar una alteración, la función de la molécula objetivo se determina antes y después de la exposición a los compuestos de prueba.

Los ensayos físicos y funcionales se han usado exitosamente para identificar los nuevos prospectos de drogas para su uso en el diseño de compuestos terapéuticos. Existen, sin embargo, limitaciones inherentes a aquellos ensayos que comprometen su precisión, confiabilidad y eficiencia. Un problema importante con los ensayos existentes, por ejemplo, se refiere a la generación de "falsos positivos". En un ensayo funcional típico, un resultado "falso positivo" se genera en el caso de un compuesto que active el ensayo pero el compuesto no resulta efectivo en cuanto a producir la respuesta fisiológica deseada. En un ensayo físico típico, un "falso positivo" es un compuesto que, por ejemplo, se ligue de por sí al blanco pero no lo hace de una manera específica (por ejemplo, un ligamiento no específico). Los falsos positivos son particularmente prevalentes y problemáticos cuando se investigan concentraciones más altas de ligandos putativos debido a que muchos compuestos presentan efectos no específicos a dichas concentraciones.

De manera similar, los ensayos existentes también se encuentran afectados por el problema de "falsos negativos", los cuales resultan cuando un compuesto produce una respuesta negativa en el ensayo pero, tal como se encontrará subsecuentemente por algún otro método, sí corresponde realmente a un ligando del blanco u objetivo. Los resultados del tipo de falsos negativos típicamente ocurren en ensayos que usen concentraciones de compuestos de prueba que bien sean demasiado altas (dando lugar a toxicidad) ó demasiado bajas, respecto del ligamiento con el blanco, o respecto de la constante de disociación del compuesto.

Otro problema con los ensayos existentes es la limitada cantidad de información que es proporcionada por el ensayo mismo. Si bien el ensayo puede identificar de manera correcta compuestos que se unan a la molécula objetivo o que produzcan una respuesta con base en la molécula objetivo, dichos ensayos típicamente no proporcionarán ninguna información acerca de ya sea sobre los sitios de ligamiento específicos presentes en la molécula objetivo, o sobre las relaciones actividad/estructura entre el compuesto que está siendo sometido a prueba y la molécula objetivo. La incapacidad para proporcionar tal información es particularmente problemática cuando el ensayo de tamizaje (investigación de la presencia de compuestos con base en cierta propiedad) esté siendo usado para identificar prospectos de drogas que luego serán objeto de estudios adicionales.

Recientemente se ha sugerido que la cristalografía por rayos X puede emplearse para identificar los sitios de ligamiento de solventes orgánicos sobre las macromoléculas. Sin embargo, este método no puede determinar las afinidades relativas por el ligamiento en diferentes sitios del blanco. Solamente es aplicable a proteínas blanco muy estables que no se desnaturalicen en presencia de altas concentraciones de solventes orgánicos. Por otra parte, debido al largo tiempo necesario para determinar las estructuras individuales de los cristales, esta técnica no

corresponde a un método apropiado para someter a prueba rápidamente un gran número de compuestos que sean químicamente diversos. Este método se limita al mapeo (mapping) de los sitios de ligamiento de solo unos pocos solventes orgánicos.

En las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5 698 401 y 5 804 390, otorgadas a Fesik, et *al.*, se revelan métodos rápidos, eficientes, y confiables para determinar el ligamiento ligando/molécula objetivo, y para el mapeo de sitios de ligamiento ubicados en la substancia objetivo. Estas patentes revelan métodos para la detección de ligamiento de un compuesto ligando a una biomolécula objetivo mediante la generación de un primero y un segundo espectros de correlación de resonancia magnética nuclear correspondientes a las biomoléculas objetivo, las cuales han sido isotópicamente enriquecidas (enriquecidas con isótopos) con el núcleo ^{15}N detectable por RMN. El primer espectro se genera a partir de los datos recolectados con base en la sustancia objetivo en ausencia de ligandos, y el segundo en presencia de uno ó más ligandos. Una comparación de los dos espectros permitirá la determinación de cual o cuales compuestos en la mezcla de ligandos putativos se ligan a la biomolécula objetivo, así como también proporcionará información específica acerca del sitio de ligamiento. Debido a que los métodos suministran información acerca de los sitios de ligamiento presentes en la molécula objetivo, los métodos pueden usarse para optimizar el diseño de los ligandos respecto de un blanco pre-seleccionado.

Debido a que los métodos RMN de Fesik, *et al., supra,* exigen sustancias objetivo que contengan nitrógeno en razón a la dependencia de dichos métodos de enriquecimiento isotópico de la molécula objetivo con ^{15}N, constituye una valiosa contribución a este campo de la industria el hecho de proporcionar un método alternativo el cual emplee un tipo diferente de molécula objetivo isotópicamente enriquecida.

Resumen de la Invención

La presente invención proporciona un método para detectar el ligamiento entre uno ó más ligandos putativos a una molécula objetivo pre-seleccionada, isotópicamente enriquecida.

La presente invención proporciona además un método de investigación o tamizaje de una mezcla de compuestos a fin de encontrar aquellos que se liguen a una molécula objetivo preseleccionada isotópicamente enriquecida.

También se suministra en la presente invención un método para determinar la constante de disociación de un compuesto ligando que se ligue a una biomolécula objetivo preseleccionada isotópicamente enriquecida.

Adicionalmente se proporciona en la presente invención métodos empleados para la determinación de los aminoácidos específicos en una molécula objetivo enriquecida con isótopos ^{13}C afectada por el ligamiento de un ligando.

La presente invención también suministra un compuesto identificado mediante un método de investigación (tamizaje) de una mezcla de compuestos con base en el ligamiento a una molécula objetivo preseleccionada isotópicamente enriquecida.

Breve Descripción de las Figuras

La Figura 1 ilustra un espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP uniformemente marcada con ^{13}C.

La Figura 2 ilustra las regiones metilo de los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP uniformemente marcada con ^{13}C antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,12 mM).

La Figura 3 ilustra las regiones metilo de los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP selectivamente marcada con $^{13}C/^{15}N/^{2}H$ en los residuos valinil y leucil antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,25 mM).

La Figura 4 ilustra las regiones metilo de los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP selectivamente marcada con ^{13}C en los residuos alanil antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,25 mM)

La Figura 5 ilustra un "modelo de palos" que muestra la estructura tridimensional de la FKBP.

Descripción Detallada de la Invención

Los términos usados a través de las presentes especificaciones tienen sus significados comúnmente aceptados. A continuación se presentan algunos términos específicos, con sus significados.

"DTT" = ditiotreitol.

"FKBP" = Proteína de ligamiento FK.

"HEPES" = ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N' -2-etilsulfónico.

"IPTG" = isopropil-β-D-tiogalactopiranósido.

"PMSF" = α-toluenosulfonil fluoruro.

"SCD" = dominio catalítico (residuos 81-256) de la estromelisina.

Cualquier biomolécula objetivo que produzca un espectro de RMN de alta resolución y que pueda uniformemente o selectivamente ser enriquecida con ^{13}C puede usarse en los métodos de la presente invención. Estos métodos son por lo tanto aplicables a cualquier biomolécula objetivo deseada enriquecida con ^{13}C, entre las que se incluyen las lipoproteínas, los fragmentos de lipoproteínas, las glicoproteínas, los fragmentos de glicoproteínas, las proteínas, los fragmentos de proteína, los polipéptidos, ADN y ARN. La abundancia isotópica natural del ^{13}C es del 1,11%. Por lo tanto, la probabilidad de que cualquier átomo de carbono dado dentro de una molécula orgánica sea ^{13}C normalmente es de aprox. 0,0111.

Con el fin de incrementar la fortaleza de una señal RMN que evidencie los datos relacionados con el acoplamiento de spín entre el núcleo de un átomo de carbono ^{13}C y cualquiera de los átomos de hidrógeno adyacentes, resulta aconsejable incrementar el contenido de ^{13}C natural de la molécula objetivo estudiada. Esto se realiza ya sea mediante el enriquecimiento uniforme o mediante el enriquecimiento selectivo de la molécula objetivo con ^{13}C. Tal como se utilizan en las presentes especificaciones y en las Reivindicaciones (presentadas éstas últimas al final del documento), los términos "enriquecimiento uniforme," "enriquecer uniformemente", "uniformemente enriquecido", "marcación uniforme" y "uniformemente marcado" se refieren al hecho de incrementar a un valor mayor a 0,0111, utilizando medios sintéticos, la probabilidad de que un átomo de carbono seleccionado al azar a través de toda la molécula objetivo sea ^{13}C. Por otra parte, los términos "enriquecimiento específico", "enriquecer específicamente", "específicamente enriquecido", "marcar específicamente" y "específicamente marcado" significan incrementar a un valor mayor de

0,0111, utilizando medios sintéticos, la probabilidad de que los átomos de carbono presentes en uno o más sitios específicos preseleccionados dentro de la molécula objetivo sea ^{13}C.

Por ejemplo, las biomoléculas expresadas por microorganismos genéticamente modificados que crezcan en un medio nutritivo que contenga glucosa uniformemente enriquecida con ^{13}C, quedarán enriquecidas uniformemente con ^{13}C. Por otra parte, una proteína expresada por un microorganismo genéticamente modificado en un medio nutritivo que contenga alanina, la cual se encuentra enriquecida con ^{13}C solamente en la cadena lateral metil, quedará específicamente enriquecida con ^{13}C en aquellos residuos alanil contenidos dentro de la proteína expresada.

El método de la presente invención, el cual emplea el enriquecimiento isotópico con ^{13}C, es aplicable a cualquier molécula objetivo orgánica, entre las que se incluyen aquellas que contengan nitrógeno. El método también permite el análisis de moléculas objetivo en las cuales los sitios con átomos de carbono específicos han sido enriquecidos (por ejemplo, los grupos metil de los residuos alanil, leucil, isoleucil, y valinil). Los grupos metilo exhiben favorable propiedades de relajamiento en comparación con los grupos amida, hecho que resulta ventajoso cuando se aplican a biomoléculas objetivo más grandes (PM > 30 kDa).

Los polipéptidos y proteínas juegan muchos papeles fundamentales en los organismos vivientes. En los ejemplos que se suministran más adelante se utilizan polipéptidos para ilustrar el presente método. Los polipéptidos y fragmentos de proteínas corresponden a clases preferidas de sustancias objetivo útiles para el método de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que el método de la presente invención es aplicable a otras sustancias objetivo que puedan ser enriquecidas con ^{13}C.

La preparación de moléculas objetivo del tipo de polipéptidos que sirven como ejemplo de uniformemente y específicamente enriquecidas con ^{13}C se discute más adelante. Un medio para preparar cantidades adecuadas de moléculas objetivo que contengan polipéptidos ya sea uniforme o específicamente enriquecidas con ^{13}C es el que involucra la transformación de una célula huésped con un vector de expresión que contenga un polinucleótido codificador del polipéptido deseado. La proteína o fragmento de proteína polipéptido se expresa mediante el cultivo de la línea de células transformadas en un medio que contenga fuentes asimilables de ^{13}C bien conocidas en este campo de la industria. Una fuente asimilable preferida para marcar uniformemente con ^{13}C es la glucosa uniformemente marcada con ^{13}C (referida en el presente documento como U-^{13}C-glucosa), producida por Cambridge Isotope Laboratories. Para efectos del marcado sitio-específico, se incluyen dentro de las fuentes asimilables de marcación sitio-específica útiles para el marcado con ^{13}C de un polipéptido objetivo, los aminoácidos específicamente marcados con ^{13}C disponibles en el mercado. En una práctica alternativa del enriquecimiento específico, las fuentes asimilables de ^{13}C contenidas en el medio nutritivo pueden serlo los precursores biosintéticos de aminoácidos marcados con ^{13}C. Por ejemplo, el α-ceto-butirato es el precursor biosintético de la isoleucina y el α-ceto-isovalerato será el precursor biosintético de tanto la valina como la leucina. El Esquema I ilustra cómo se pueden sintetizar los precursores biosintéticos específicamente enriquecidos con ^{13}C de la leucina, isoleucina, y valina. Puede emplearse el yoduro de metilo enriquecido con ^{13}C ($H_3{}^{13}CI$), comparativamente poco costoso, como la fuente de enriquecimiento isotópico para producir ácido α-ceto-butírico y ácido α-ceto-isovalérico marcados terminalmente en C.

El uso de un nutriente uniformemente enriquecido con ^{13}C tal como la glucosa enriquecida con ^{13}C es un medio conveniente para introducir

enriquecimiento con ^{13}C dentro de una sustancia objetivo; sin embargo, este método es muy costoso. Adicionalmente, una vasta mayoría de los sitios carbono presentes en los objetivos uniformemente marcados con ^{13}C tendrán un vecino ligado covalentemente el cual también se encuentra marcado con ^{13}C, con la introducción de un acoplamiento ^{13}C-^{13}C el cual puede afectar negativamente tanto la relación señal/ruido como las propiedades de relajación de los sitios marcados con ^{13}C en la biomolécula objetivo. Una ventaja particular se logra por la marcación sitio-específica del polipéptido objetivo con ^{13}C. Tal como se anotó antes, esto puede realizarse mediante la inclusión en el medio nutritivo de aminoácidos marcados con ^{13}C comercialmente disponibles. Esto también, sin embargo, constituye una alternativa costosa, pero puede ser deseable en ciertas circunstancias cuando se requiera efectuar el marcado de cierto tipo de residuos aminoacil en el polipéptido objetivo. Sin embargo, el método preferido para la marcación con ^{13}C de una molécula objetivo polipéptido es el que comprende el crecimiento de la línea de células genéticamente modificadas en un medio nutritivo que contenga precursores biosintéticos de aminoácidos marcados con ^{13}C. En particular, entre los precursores preferidos de aminoácidos a ser marcados se incluyen el ácido α-ceto-butírico y el ácido α-ceto-isovalérico. Los productos biosintéticos de estos precursores son leucina, isoleucina, y valina en los cuales los grupos metilo de la cadena lateral metil, en particular, se encuentran enriquecidos con ^{13}C. Debido a que los grupos metilo tienen cada uno tres átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono marcado con ^{13}C, las señales de RMN correspondientes serán particularmente fuertes y diferenciables.

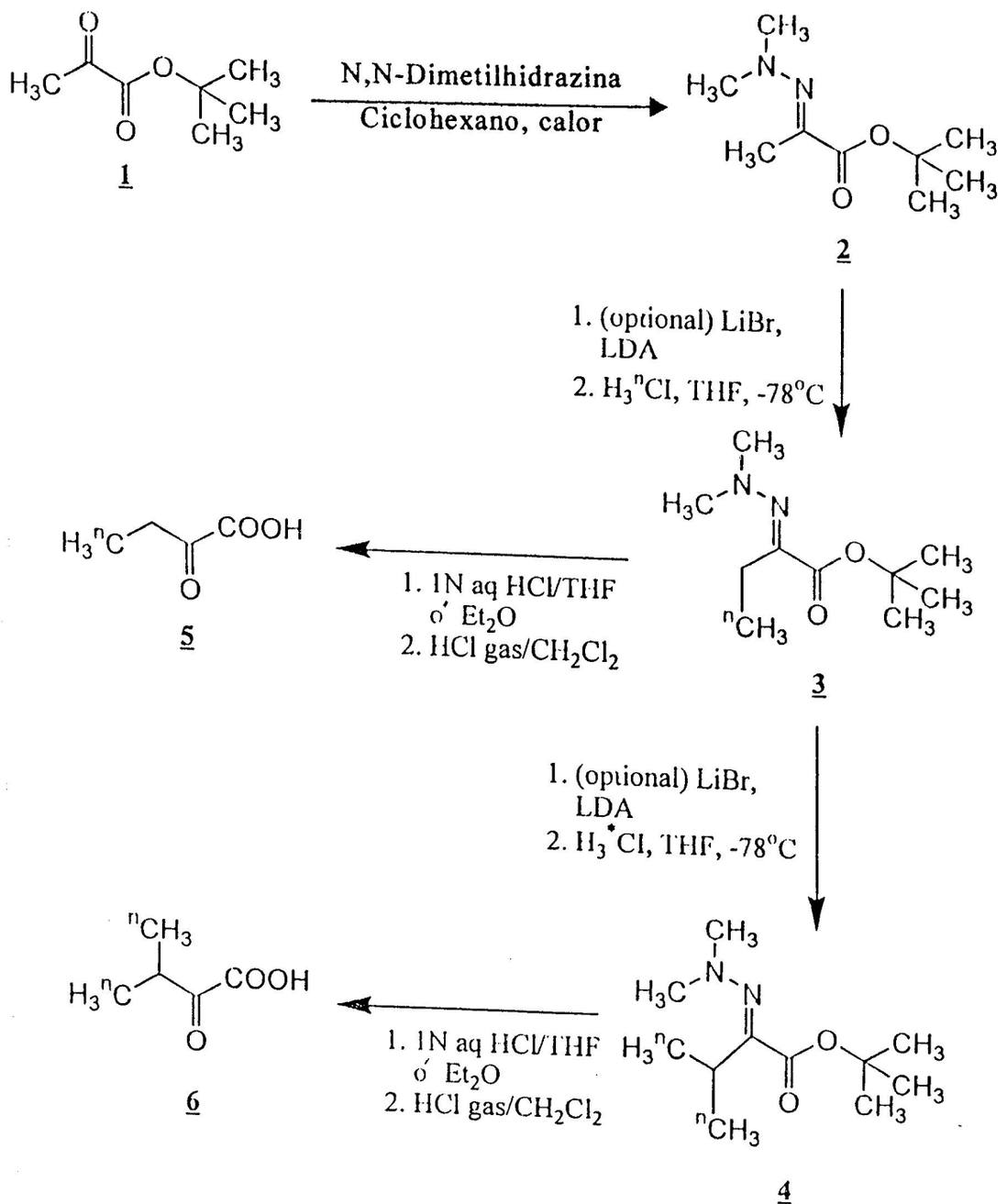
La secuencia de la síntesis del ácido α-ceto-butírico y del ácido α-ceto-isovalérico marcados involucra la metilación del átomo de carbono terminal presente en el ácido pirúvico con metil yoduro enriquecido con ^{13}C. Normalmente, la alquilación de α-ceto ácidos, tal como el piruvato,

es inherentemente difícil y va acompañada por una descomposición del intermediario enolato con la formación de numerosos productos secundarios. Sin embargo, T. Spencer, et *al., Tetrahedron Letters,* 1975, 3889, y D. R. Williams, et *al., ibid,* 1990, 5881, han demostrado que la alquilación de la oxima correspondiente puede fácilmente realizarse y D. Enders, *et al., Angew. Chem. Int. Eng. Ed.,* 1992, 618 y D. Enders, et *al., Synlett,* 1992, 901 han demostrado que la hidrazona también se alquila fácilmente sin descomposición.

En el Esquema I, el *tert*-butil piruvato, **1**, se convierte a la correspondiente N,N-dimetilhidrazona, **2**, por reacción con N,N-dimetilhidrazina en dietil éter a temperatura ambiente. La hidrazona resultante, **2**, se enfría en una solución de tetrahidrofurano a -78^{0}C, y se trata con bromuro de litio, a lo cual sigue el tratamiento con la diisopropilamida de litio para formar el intermediario aza-alil enolato. El enolato se alquila con metil yoduro marcado con ^{13}C para producir la hidrazona **3**. Un segundo curso de la alquilación de **3** produce la hidrazona dimetilada marcada, **4**. El tratamiento de **3** y **4** con ácido trifluoroacético en cloruro de metileno a 0°C cliva (escinde) tanto la hidrazina y como los grupos éster para producir los correspondientes α-cetoácidos marcados terminalmente con ^{13}C, **5** y **6** (ácido 4-(^{13}C)-butírico y el ácido 4-(^{13}C)-3-(^{13}C)-metilbutírico, respectivamente).

Esquema I

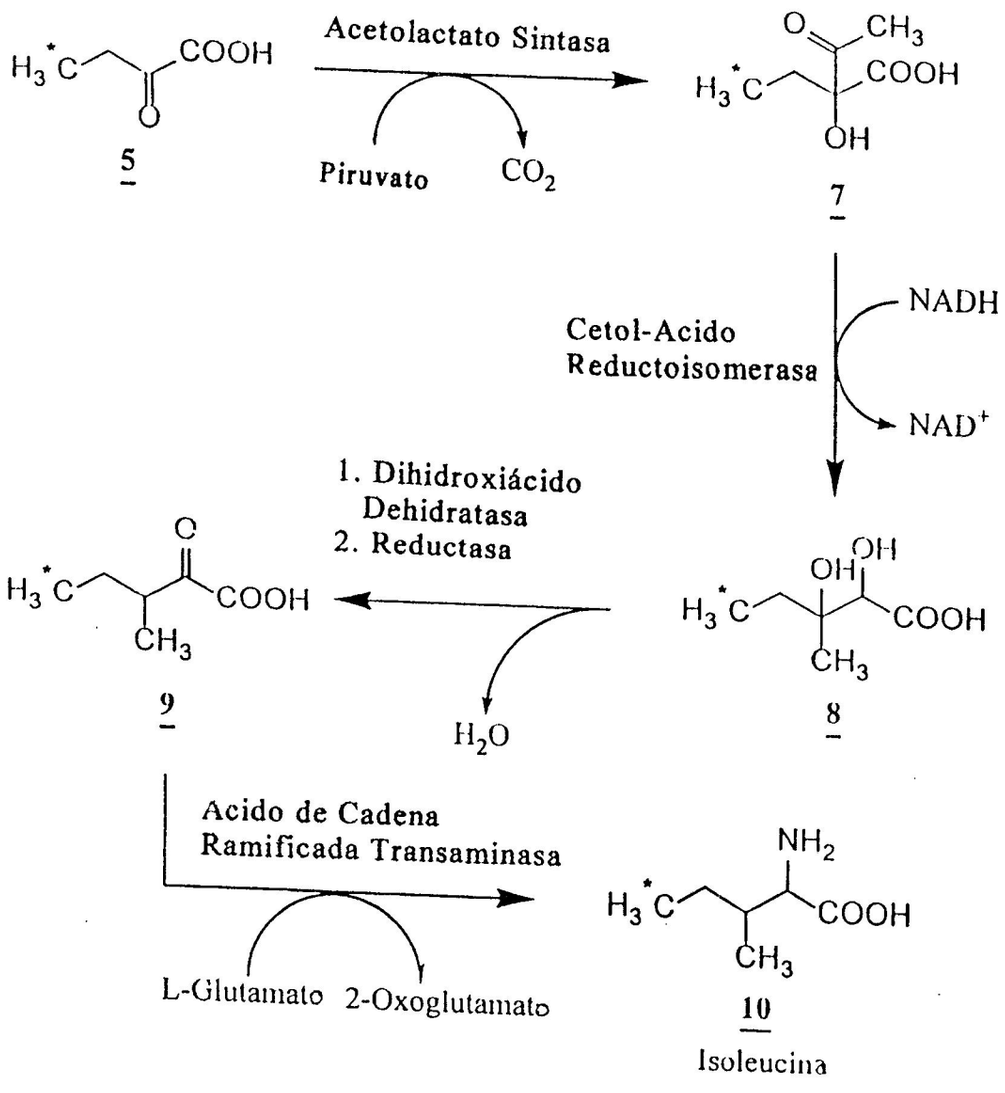
Síntesis Química de Precursores Marcados



Los Esquemas de Reacción II, III, y IV ilustran, respectivamente, como estos α-cetoácidos se convierten biosintéticamente en ^{13}C-leucina, ^{13}C-isoleucina, y ^{13}C-valina. En todos los Esquemas, los sitios con enriquecimiento isotópico se indican con asteriscos.

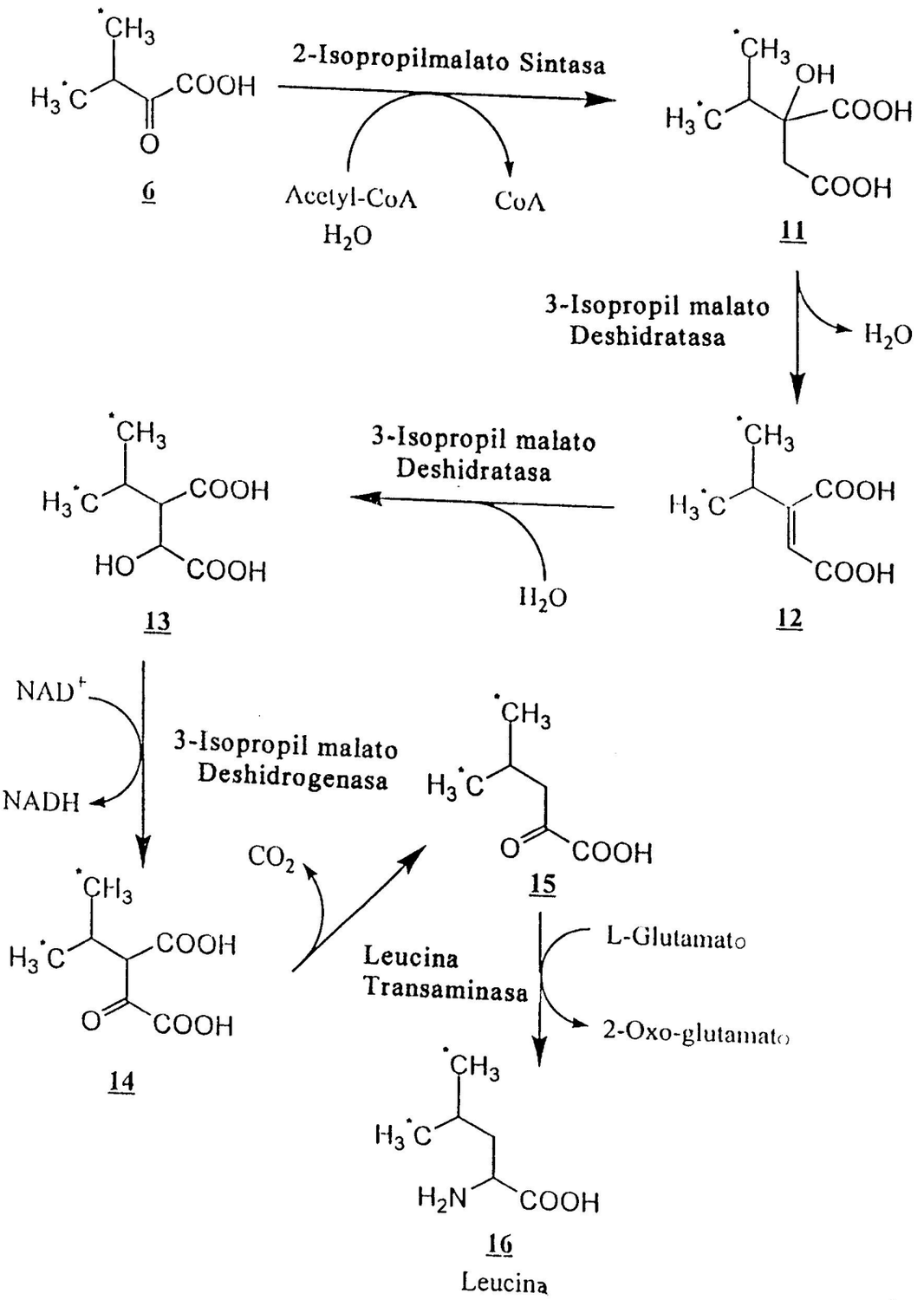
Esquema II

Síntesis Bioquímica de Isoleucina Marcada



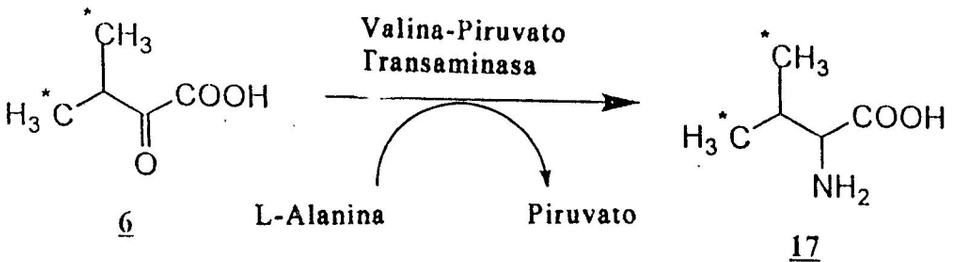
Esquema III

Síntesis Bioquímica de Leucina Marcada



Esquema IV

Síntesis Bioquímica de la Valina



6

17

L-Valina

Los medios para la preparación de vectores de expresión que contienen secuencias de polinucleótidos codificadoras de polipéptidos específicos y los medios para la transformación de células húesped con estos vectores son bien conocidos en este campo de la industria (véase, por ejemplo, R. W. Old, et al. "Techniques of Gene Manipulation", Blackwell Science, London, 1994, y similares tratados en este campo). De igual forma, los métodos para el cultivo de células transformadas que expresen el polipéptido codificado y para aislar, purificar y re-plegar el polipéptido son también bien conocidos en este campo de la industria. Los Ejemplos presentados más adelante describen la producción, a partir de *E. coli* modificada, de muestras enriquecidas con ^{13}C de la región catalítica, comprendida entre los aminoácidos 81-256, de la estromelisina humana y la proteína de ligamiento FK (FKBP), y el uso de estos polipéptidos enriquecidos isotópicamente en los presentes métodos.

En el caso en que el método se emplee para investigar la presencia (screen) de uno o más compuestos por su ligamiento a la molécula objetivo, por ejemplo de entre una mezcla ó de una biblioteca de compuestos, y en los casos en donde surja diferencias entre el primer

espectro generado correspondiente a la molécula objetivo sola y el generado para la molécula objetivo en presencia del o los compuestos, se ejecutarán pasos adicionales para identificar cual o cuales compuestos específicos contenidos en la mezcla se ligan realmente a la molécula objetivo. Entre dichos pasos adicionales se incluyen la exposición de la molécula objetivo enriquecida con isótopos ^{13}C individualmente a cada compuesto de la mezcla; generación de un espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de la molécula objetivo marcada que ha sido individualmente expuesta a cada compuesto; y comparación de cada espectro con el primer espectro generado de la molécula objetivo sola para determinar así las diferencias entre cualquiera de los espectros comparados. Las diferencias en los espectros facilitan la identificación de un compuesto que se comporte como un ligando.

Los valores de corrimiento químico de las señales particulares $^{13}C/^{1}H$ en el espectro de correlación bidimensional correspondiente a ubicaciones específicas conocidas de agrupaciones átomicas presentes en la molécula objetivo (por ejemplo, los átomos de carbono de un residuo particular aminoácido en la molécula objetivo o, en el caso de un polipéptido específicamente marcado en los grupos metilo de residuos alanil, leucil, isoleucil, y valinil). El proceso de screening (tamizaje: investigación de presencia de ciertos compuestos) de esta invención no sólo permite la identificación de cual o cuales compuestos están ligados a una molécula objetivo en particular, sino que también permite la determinación de los aminoácidos particulares que son afectados por el ligamiento del compuesto a la molécula objetivo. Los valores de corrimiento químico pueden reflejar un cambio en la conformación de la molécula objetivo, o pueden reflejar el ligamiento del compuesto ligado al sitio que corresponde a la señal en particular.

Además, mediante este proceso puede determinarse la constante de

disociación, K_D, para un ligando dado y su molécula objetivo, si se desea, mediante la generación de un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de una molécula objetivo marcada con ^{13}C; la exposición de la molécula objetivo marcada versus diversas concentraciones de un ligando; la generación de un espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional para cada concentración del ligando empleado; la comparación de los espectros generados versus el primer espectro de la molécula objetivo; y el cálculo de la constante de disociación entre la molécula objetivo y el ligando a partir de dichas diferencias usando la Ecuación 1:

$$K_D = \frac{([P_0]-x)([L_0]-x)}{x}$$

en donde $[P_0]$ es la concentración molar total de la molécula objetivo, $[L_0]$ es la concentración molar total del ligando, y x es la concentración molar de la especie ligada. El valor de x se determina a partir de los datos de corrimiento químico de la RMN de acuerdo con la Ecuación 2:

$$x = \frac{\delta_{observado} - \delta_{libre}}{\Delta}$$

en donde $\delta_{observado}$ es el valor del corrimiento químico observado, δ_{libre} es el valor del corrimiento químico para la especie libre, y Δ es la diferencia entre el valor del corrimiento químico limitante para la saturación ($\delta_{saturación}$) y el valor del corrimiento químico de la molécula objetivo libre del ligando ligado (δ_{libre}).

La constante de disociación luego se determina variando su valor hasta que se obtenga un mejor ajuste con los datos observados usando los métodos estadísticos estándares de ajuste de curvas. En aquellas

situaciones en donde el valor de $\delta_{saturación}$ no se conoce directamente, K_D y $\delta_{saturación}$ se varían y los datos resultantes se someten al mismo método estadístico de ajuste de curvas.

Una capacidad ventajosa del método de investigación (tamizaje) es su capacidad para determinar la constante de disociación de un ligando de la molécula objetivo en presencia de una segunda molécula ya ligada al ligando. Esto generalmente no es posible hacerlo con otros métodos que emplean los métodos analíticos "wet chemical" (de compuestos químicos en húmedo) de determinación del ligamiento de un ligando a un substrato constituido por una molécula objetivo.

El proceso para la determinación de la constante de disociación de un ligando puede ejecutarse en presencia de un segundo ligando ligado. En consecuencia, la molécula objetivo marcada con ^{13}C se liga a dicho segundo ligando antes de la exposición de la molécula objetivo a los compuestos de prueba. El método de investigación de compuestos (tamizaje) es adicionalmente capaz de proporcionar información respecto del ligamiento de un segundo o subsecuente ligando a la molécula objetivo. Este segundo ligando puede químicamente unirse con el primer ligando ligado a la molécula objetivo, proporcionando así una nueva molécula compuesta de uso para la modificación o afectación de la molécula objetivo.

El método de tamizaje de la presente invención comienza con la generación o toma de un espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de la molécula objetivo isotópicamente enriquecida. Como se estableció antes, la molécula objetivo puede bien ser enriquecida uniformemente con ^{13}C, o puede específicamente enriquecerse mediante la incorporación de grupos ^{13}C-metil en residuos alanil, leucil, valinil, e isoleucil. Medios de generación de espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ bidimensionales

son bien conocidos en este campo de la industria. Los espectros RMN que son típicamente registrados corresponden a espectros de correlación cúantica sencillos heteronucleares $^{13}C/^{1}H$ bidimensionales (HSQC, sigla de Heteronuclear Single Quantum Correlation), aunque pueden usarse otras técnicas conocidas por los expertos en este campo de la industria. Debido a que las señales $^{13}C/^{1}H$ correspondientes a la proteína normalmente exhiben una excelente resolución, los cambios en los corrimientos químicos para los pares $^{13}C/^{1}H$ individuales, pueden fácilmente monitorearse. Un espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ bidimensional representativo de un polipéptido objetivo marcado con ^{13}C (FKBP) es ilustrado en la Figura 1. Un espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ bidimensional representativo de una FKBP específicamente enriquecida con ^{13}C es el que se ilustra en la Figura 3.

Luego de la exposición de la molécula objetivo marcada con ^{13}C a uno ó más compuestos de prueba, se genera un segundo espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ RMN bidimensional. Dicho espectro se genera de la misma manera establecida anteriormente. Los espectros primero y segundo luego se comparan para determinar si existen diferencias entre los dos espectros. Las diferencias en los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ RMN bidimensionales que indiquen la presencia de un ligando corresponden a sitios de la molécula objetivo marcados con ^{13}C. Aquellas diferencias se determinan usando procedimientos estándares bien conocidos en este campo de la industria. La Figura 2 muestra las regiones metil de FKBP uniformemente marcada con ^{13}C antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,12 mM).

Las señales particulares en un espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ bidimensional corresponden a átomos de carbono y protones específicos presentes en la molécula objetivo (por ejemplo, particularmente los

grupos metilo de los residuos aminoácido de la proteína). A manera de ejemplo, puede observarse en la Figura 3 cómo los corrimientos químicos observados en los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ bidimensionales de la FKBP expuesta a un compuesto de prueba ocurrieron en las posiciones residuales 97 (leucina) y 55 (valina). La región de la proteína que es responsable del ligamiento a los compuestos individuales se identifican a partir de los pares átomo de carbono-protón particulares que cambian con la adición del compuesto.

EJEMPLOS

Preparación 1

Preparación del Dominio Catalítico de la Estromelisina Humana (SCD) Uniformemente Enriquecido con ^{13}C

Se preparó el fragmento 81-256 (ID SEC NO: 1) de la estromelisina (SCD) mediante la inserción de un plásmido que codifica para la producción del fragmento de proteína dentro de una cepa de *E. coli* haciendo crecer la cepa bacteriana genéticamente modificada en un medio de cultivo apropiado. El fragmento de proteína se aisla del medio de cultivo, se purifica y subsecuentemente se utiliza en el análisis RMN bidimensional de su afinidad con compuestos de prueba en concordancia con el método de la presente invención. Los procedimientos de los procesos de preparación se describen a continuación.

Se hicieron crecer fibroblastos de la piel humana (ATCC No. CRL 1507) y se indujeron utilizando el procedimiento descrito por Clark *et al., Archiv. Biochem. and Biophys.* 241: 36 (1985). Se aisló el ARN total de 1 g de células usando el kit RNAgents® Total RNA Isolation System Kit (Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se desnaturalizó una porción de 1 μg del ARN por calentamiento a 80°C durante cinco minutos y luego se sometió a la PCR de la transcriptasa reversa usando un kit GenAmp® RNA PCR (Applied Biosystems/Perkin-Elmer) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La PCR anidada se realizó usando en primer lugar los primers [cebadores] (a) GAAATGAAGAGTCTTCAA (ID SEC NO: 2) y (b) GCGTCCCAGGTTCTGGAG (ID SEC NO. 3) y treinta y cinco ciclos de 94°C, dos minutos; 45°C, dos minutos; y 72°C, tres minutos. A lo

anterior siguió una re-amplificación utilizando los primers internos (c) TACCATGGCCTATCCATTGGATGGAGC (ID SEC NO: 4) y (d) ATAGGATCCTTAGGTCTCAGGGGA GTCAGG (ID SEC NO: 5) usando treinta ciclos bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para generar una secuencia de ADN codificadora de los residuos aminoácido 1-256 de la estromelisina humana.

El fragmento PCR luego se clona dentro del vector de clonación PCR pT7BIue® (Novagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido resultante se corta con NcoI y BamHI y el fragmento de la estromelisina se subclona dentro del vector de expresión pET3d (Novagen, Inc.).

Un constructo de expresión maduro de la estromelisina que codifique para los residuos aminoácido 81-256 más un residuo aminoacil metionina iniciador son generados a partir del constructo de expresión 1-256 mediante amplificación por PCR. El fragmento PCR resultante primero se clona dentro del vector pT7BIue® (Novagen, Inc.) y luego se sub-clona dentró del vector pET3d (Novagen, Inc.), usando las instrucciones del fabricante de la manera antes descrita, a fin de producir el plásmido pETST-83-256. Este plásmido final es idéntico al descrito por Qi-Zhuang *et al., Biochemistry,* 31: 11231 (1992) con la excepción de que el presente plásmido codifica para una secuencia peptídica que comienza dos aminoácidos más antes en la posición 81, en la secuencia de la estromelisina humana. El plásmido pETST-83-256 se transforma dentro de la cepa de *E. coli* BL2l(DE3)/pLysS (Novagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para generar así una cepa de expresión, BL21(DE3) /pLysS/pETST-255-1.

Se prepara un medio de pre-cultivo por disolución de 1,6989 g de $NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$, 0,45 g de KH_2P0_4, 0,075 g de NaCl, 0,150 g de NH_4Cl,

0,3 g de U-^{13}C-glucosa, 300 µL de una solución acuosa de $MgSO_4$, y 15 mL de una solución acuosa de $CaCl_2$ en 150 mL de agua desionizada. La solución resultante del medio de pre-cultivo se esteriliza y se transfiere a un baffle flask estéril de 500 mL. Inmediatamente antes de la inoculación del medio de pre-cultivo con la cepa bacteriana, se agregan al contenido del recipiente 150 mL de una solución que contiene 34 mg/mL de cloranfenicol en etanol al 100% y 1,5 ml de una solución que contiene 20 mg/mL de ampicilina. El contenido del recipiente luego se inoculó con 1 ml de stock en glicerol de la cepa genéticamente modificada del E. coli BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1. El contenido del recipiente se agita (225 rpm) a 37°C hasta obtener una densidad óptica de 0,65.

Se preparó un medio nutritivo de fermentación por disolución de 113,28 g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 30 g de KH_2P0_4, 5 g de NaCl y 10 mL de agente antiespumante DF-60 al 1% en 9604 mL de agua desionizada. Esta solución se colocó en un fermentador New Brunswick Scientific Micros Fermenter y se esterilizó a 121°C durante 40 minutos. Inmediatamente antes de la inoculación del medio de fermentación, se agregaron los siguientes componentes pre-esterilizados al contenido del recipiente de fermentación: 100 ml de una solución acuosa al 10% de NH_4Cl, 15 g de glucosa uniformemente enriquecida con ^{13}C, 20 ml de una solución acuosa 1M de $MgSO_4$, 1 ml de una solución acuosa 1M de $CaCl_2$, 5 ml de una solución acuosa de clorhidrato de tiamina (10 mg/mL), 10 ml de una solución que contenía 34 mg/mL de cloranfenicol en etanol al 100%, y 1,9 g de ampicilina disuelta en la solución de cloranfenicol. El pH de la solución resultante se ajustó a pH 7,00 mediante de la adición de una solución acuosa de H_2SO_4 4N.

El pre-cultivo de la cepa de E. coli BL21(DE3)/pLysS/PETST-255-1 proveniente del procedimiento a escala del recipiente agitado descrito

anteriormente, se agrega al contenido del fermentador y se permite el crecimiento de las células hasta lograr una densidad óptica de 0,48. Durante este proceso, el contenido del fermentador se mantiene automáticamente a pH 7,0 a través de la adición de H_2SO_4 4N ó de KOH 4N, según sea necesario. El contenido de oxígeno disuelto en el contenido del fermentador se mantiene por encima del 55% con saturación de aire, mediante un ciclo en cascada (cascaded loop) el cual incrementa la velocidad de agitación cuando el contenido de oxígeno disuelto cae por debajo del 55%. El aire se alimenta al contenido del fermentador a 7 litros por minuto standard (standard liter per minute: SLPM) y la temperatura del cultivo se mantiene a 37°C durante todo el proceso.

Las células se cosechan por centrifugación a 17000 x g durante 10 minutos a 4°C y los pellets de células, resultantes, se recogen y conservan a - 85°C. El rendimiento celular en húmedo es 3,5 g/L. El análisis de las fracciones solubles e insolubles de los lisados celulares por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) revela que aproximadamente 50% de la estromelisina se encuentra en la fase soluble.

El fragmento estromelisina preparado como se describió antes se purifica empleando una modificación de la técnica descrita por Ye, *et al., Biochemistry,* 31: 11231 (1992). Las células cosechadas se suspendieron en buffer Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), solución de azida de sodio que contenía $MgCl_2$ 1 mM, $ZnCl_2$ 0,5 mM, 25 unidades/ml de la enzima Benzonase® (Benzon Pharma), y una mezcla de inhibidores compuesta por 4-(2-aminoetil)bencenosulfonil fluoruro ("AEBSF"), Leupeptin®, Aprotinin® y Pepstatin® (todos a concentraciones de 1 mg/mL). El AEBSF, Leupeptin®, Aprotinin®, y Pepstatin® son producidos por American International Chemical. La mezcla resultante se agita

suavemente durante una hora y luego se enfría a 4°C. Las células luego se rompen (lisan) con ultrasonido usando un ciclo de trabajo del 50%. El lisado resultante se centrifuga a 14 000 rpm durante 30 minutos y la fracción insoluble del pellet se congela a - 80°C para su posterior procesamiento.

Se agrega sulfato de amonio sólido al sobrenadante hasta lograr un nivel del 20% de saturación y la solución resultante se carga en una columna de 700 mL de fenil Sepharose de flujo rápido ("Q-Sepharose FF") (Pharmacia Biotech.). Antes de cargarla, la columna de Sepharose se equilibra con buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7,6 a 4°C), $CaCl_2$ 5 mM, y $(NH_4)_2SO_4$ 1 M. La columna cargada se eluye con un gradiente lineal de concentraciones decrecientes de $(NH_4)_2SO_4$ acuoso (decreciendo desde 1 M hasta 0 M) y concentraciones crecientes de $CaCl_2$ acuoso (desde 5 mM hasta 20 mM) en buffer Tris-HCl a ph 7,6. Las fracciones activas del eluato se recolectaron y concentraron en una celda agitada Amicon (Amicon, Inc.). La muestra concentrada se dializa en el transcurso de una noche en el buffer inicialmente usado con la columna Q-Sefarose FF, Tris-HCl 50 mM (pH 8,2 a 4°C) y $CaCl_2$ 10 mM.

La muestra dializada luego se carga en la columna Q-Sepharose FF y se eluye con un gradiente lineal que comprende el buffer inicial y NaCl 200 nM. La fracción soluble purificada del fragmento estromelisina se concentra y conserva a 4°C. El pellet se solubiliza en 8M de guanidina-HCl. La solución se centrifuga durante 20 minutos a 20 000 rpm y el sobrenadante se agrega gota a gota a un buffer de plegamiento (folding buffer) que comprende Tris-HCl 50 mM (pH 7,6), $CaCl_2$ 10 mM, $ZnCl_2$ 0,5 mM y el cóctel de inhibidores compuesto por AEBSF, Leupeptin®, Aprotinin®, y Pepstatin® (todos a concentraciones de 1 µg/mL). El volumen del buffer de plegamiento es entonces 10 veces el del sobrenadante. La mezcla del sobrenadante y del buffer de plegamiento se

centrifuga a 20 000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación se conserva a 4°C y el pellet se somete dos veces a los pasos antes descritos de solubilización en guanidina-HCl, re-plegamiento en el buffer, y centrifugación. Los sobrenadantes finales provenientes de cada una de las tres centrifugaciones se combinan y se agrega sulfato de amonio sólido hasta lograr un punto de saturación del 20%. La solución resultante de esta manera obtenida a partir de la fracción insoluble se somete a purificación en fenil Sepharose y Q-Sepharose tal como se describió antes para la fracción soluble. Las fracciones solubles e insolubles purificadas se combinan para producir aprox. 1,8 mg del fragmento purificado 81-256 (SCD) de la estromelisina por gramo de pasta original de células, uniformemente enriquecida con ^{13}C.

Preparación 2

Preparación del Dominio Catalítico de la Estromelisina Humana (SCD) Específicamente Enriquecido con ^{13}C

El SCD se expresa mediante el cultivo de la cepa modificada de *E. Coli* BL21(DE3)/pLysS/pETST-255-1 en un medio que comprende ácido α-ceto-butírico y ácido α-ceto-isovalérico enriquecidos con ^{13}C. Los métodos usados para la preparación de la cepa de *E. Coli* diseñada por ingeniería genética, y para la expresión, aislamiento, y purificación del fragmento de proteína corresponden a los anteriormente descritos, excepto por el uso U-^{12}C-glucosa, en lugar de U-^{13}C-glucosa.

Preparación 3

Preparación de FKBP Uniformemente y Específicamente Enriquecida con ^{13}C

A. Preparación de FKBP con Val/Leu Específicamente enriquecidas con ^{13}C

Se hicieron crecer células transformadas con un plásmido codificador de la FKBP humana (como se describe en Egan, *et al., Biochemistry* 32: 1920-1927 (1993)) en un medio de cultivo con D_2O al 100% que contenía $^{15}NH_4Cl$ (Cambridge Isotopes) a manera de la única fuente de nitrógeno (1,0 g/L) y glucosa perdeuterada (1,5 g/L) a manera de la fuente de carbono (Cambridge Isotopes). Las células se hicieron crecer a 37°C y el contenido del recipiente se agitó hasta obtener una densidad óptica de 1,0. Una hora antes de la inducción, se agregaron 80 mg de L-valina-U-$^{13}C_5$-^{15}N-2,3-d_2 (Cambridge Isotopes) al medio de cultivo. El cultivo se indujo con IPTG 1 mM durante 12 horas.

Las células se cosecharon por centrifugación a 17 000 x g durante 10 minutos a 4°C y los pellets de células resultantes se suspendieron en buffer de fosfatos 50 mM (pH 7,4) que contenía DTT 5 mM y PMSF 1 mM y se lisaron mecánicamente usando una prensa French. El lisado resultante se centrifugó a 25 000 rpm durante 30 minutos. Se agregó sulfato de amonio sólido al sobrenadante hasta el punto de 40% de saturación y se centrifugó a 18 000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se dializó dentro de HEPES 10 mM (pH 8,0) durante 12 horas a 4°C. La solución resultante luego se cargó en una columna de 10 mL Q-Sepharose de flujo rápido (Sigma) pre-equilibrada en el buffer de diálisis. Las fracciones se recogieron, se reunieron, y se concentraron usando una celda de flujo Amicon. La solución luego se dializó dentro de buffer de fosfatos 20 mM (pH 6,5) que contenía DTT 10 mM y azida de sodio al 0,01%.

B. Preparación de FKBP con Val/Leu/Ile Específicamente Enriquecidas con ^{13}C

Células transformadas con un plásmido codificador de la FKBP humana (como el descrito en Egan, *et al., Biochemistry* 32: 1920-1927 (1993)) se hicieron crecer en un medio de cultivo que contenía NH_4Cl como la única fuente de nitrógeno (1,0 g/L) y glucosa (1,5 g/L) como la fuente de carbono. Las células se hicieron crecer a 37°C y el contenido del recipiente se agitó hasta que fuera obtenida una densidad óptica de 1,0. Una hora antes de la inducción, se agregaron 100 mg de ácido α-ceto-butírico y de ácido α-ceto-isovalérico al medio de cultivo. El cultivo se indujo con IPTG 1 mM durante 12 horas. La expresión, aislamiento, y purificación de la proteína expresada se efectuaron tal como se describió antes.

C. Preparación de FKBP Uniformemente Enriquecida con ^{13}C

Se hicieron crecer células transformadas con un plásmido que codifica para la FKBP humana (como se describe en Egan, *et al., Biochemistry* 32: 1920-1927 (1993)) en un medio de cultivo que contenía $^{15}NH_4Cl$ (Cambridge Isotopes) como la única fuente de nitrógeno (1,0 g/L) y glucosa uniformemente enriquecida con ^{13}C (1,5 g/L) como la fuente de carbono (Cambridge Isotopes). La expresión, aislamiento, y purificación de la proteína expresada se efectuaron tal como se describió antes.

Ejemplo 1

Investigación de la Presencia de Ligandos Usando Espectros de Correlación de RMN $^{13}C/^{1}H$ y FKBP Uniformemente Enriquecida con ^{13}C

La FKBP uniformemente enriquecida con ^{13}C se preparó de acuerdo con los procedimientos antes detallados. Las soluciones de proteína usadas en el ensayo de investigación contenían la FKBP uniformemente enriquecida con ^{13}C (0,2 mM) y azida de sodio (0,05%) en un solución de H_2O/D_2O (9/1) buferizada (amortiguada) con fosfatos (20 mM, pH 6,5).

Los espectros RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensionales se generaron a 30°C en un espectrómetro de RMN Bruker DRX500 equipado con una sonda de triple resonancia y un cambia-muestras Bruker. Los espectros HSQC $^{13}C/^{1}H$ se tomaron a manera de 64 x 1024 puntos complejos usando amplitudes de barrido de 3 771 Hz (^{13}C, t_1) y 8 333 Hz (^{1}H, t_2). Se empleó un retardo de 1 segundo entre escaneos y 8 escaneos por decaimiento de la inducción libre (free induction decay: fid) en la recolección de los datos. Todos los espectros RMN se procesaron y analizaron en $^{13}C/^{1}H$ computadores Silicon Graphics.

Se tomó un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional para la molécula objetivo FKBP marcada con ^{13}C tal como se describió antes. El objetivo FKBP luego se expuso a la mezcla bibliotecal de compuestos de prueba. Las soluciones stock de los compuestos se prepararon a concentraciones de 100 mM y 1 M. Por otra parte, se preparó una biblioteca de combinaciones la cual contenía 8 - 10 compuestos por muestra a una concentración de 100 mM por cada compuesto.

El pH de la solución de stock 1 M se ajustó con ácido acético y etanolamina de modo que no se observará ningún cambio de pH al hacer la dilución 1/10 con una solución buferizada con fosfatos 100 mM (pH 7,0). Es importante ajustar el pH, debido a que pequeños cambios en el pH pueden alterar los corrimientos químicos de las biomoléculas y complican la interpretación de los datos de RMN.

Los compuestos presentes en la biblioteca se seleccionaron con base en el tamaño (peso molecular entre 100 - 300) y diversidad molecular. Las moléculas en la colección presentaban diferentes formas (por ejemplo, anillos aromáticos planos, anillos alifáticos plegados, alifáticos de cadena recta y ramificada con enlaces sencillos, dobles o triples) y diversos grupos funcionales (por ejemplo, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, aminas, aldehidos, cetonas, y diversos anillos heterocíclicos) con el fin de maximizar la posibilidad de descubrir compuestos que interactuaran con los sitios de ligamiento ampliamente diversos.

Las muestras para RMN se prepararon mediante la adición de 1,25 µL de la solución stock en dimetilsulfóxido de las mezclas de compuestos que contenían cada compuesto a una concentración de 100 mM respecto de 0,5 mL de una solución en H_2O/D_2O (9/1) bufferizada de la proteína uniformemente ^{13}C-marcada. La concentración final de cada uno de los compuestos en la muestra para RMN era de aprox. 0,25 mM.

En el experimento de tamizaje (screening: investigación de la presencia de compuestos), se encontró que un compuesto, el 2-fenilimidazol, se liga a la FKBP. La Figura 1 ilustra el espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP uniformemente marcada con ^{13}C. El espectro (128 puntos complejos, 4 escaneos/fid) se tomó en una muestra de FKBP 0,1 mM en buffer de fosfatos 20 mM (pH 6,5), azida de sodio al 0,01% y óxido de deuterio (D_2O) al 10%.

La Figura 1 ilustra un espectro de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP uniformemente marcada con ^{13}C. El espectro (128 puntos complejos, 4 escaneos/fid) se tomó en una muestra de FKBP 0,1 mM en buffer de fosfatos 20 mM (pH 6,5), azida de sodio al 0,01% y óxido de deuterio (D_2O) al 10%. La Figura 2 ilustra las regiones metilo de los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ (64 puntos complejos, 8 escaneos/fid) de la FKBP

uniformemente marcada con ^{13}C (0,2 mM) antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,25 mM). Se indican los cambios en los corrimientos químicos ocurridos en los residuos aminoacil Leu^{97}, Val^{55}, ile^{56} e ile^{90}.

La Figura 3 ilustra los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ (48 puntos complejos, 8 escaneos/fid) de la FKBP selectivamente marcada con $^{13}C/^{15}N/^{2}H$ en residuos valinil y leucil antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,25 mM). Todas las demás condiciones fueron las mismas que las empleadas en la generación de los espectros ilustrados en la Figura 1. Se indican aquellos residuos escogidos que indican cambios significativos en el ligamiento. Nuevamente, los cambios en los valores de corrimiento químico indican que el ligamiento está ocurriendo en, o cerca, a los residuos Leu^{97} y Val^{55}.

La Figura 4 presenta los espectros de correlación $^{13}C/^{1}H$ de la FKBP selectivamente marcada con ^{13}C en los residuos alanil antes (contornos múltiples delgados) y después (contornos únicos gruesos) de la adición de 2-fenilimidazol (0,25 mM). La sobreposición de los valores de corrimiento químico antes (contornos múltiples livianos o normales) y después (contornos únicos repisados o en negrilla) de la adición del ligando indican que ninguno de los residuos alanil está involucrado en el ligamiento.

La Figura 5 presenta una ilustración del tipo de "modelo de palos" de la estructura tridimensional de la FKBP. Los residuos aparecen numerados para efectos de ayudar en la visualización. Los residuos aminoacil involucrados en el sitio de ligamiento en la proteína se muestran negrilla.

Reivindicaciones

1. Un método para detectar el ligamiento entre un ligando putativo y una molécula objetivo pre-seleccionada enriquecida con ^{13}C, método que comprende:

a) generación de un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de dicha molécula objetivo;

b) formación de una mezcla de dicha molécula objetivo con por lo menos un compuesto ligando putativo;

c) generación de un segundo espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de la mezcla del paso (b); y

d) comparación del primero y segundo espectros.

2. El método acorde con la Reivindicación 1, en donde dicha molécula objetivo se selecciona del grupo conformado por lipoproteínas, fragmentos de lipoproteínas, glicoproteínas, fragmentos de glicoproteínas, proteínas, fragmentos de proteína, polipéptidos, ADN, y ARN.

3. El método acorde con la Reivindicación 1, en donde dicha molécula objetivo se selecciona del grupo conformado por proteínas, fragmentos de proteína, y polipéptidos.

4. El método acorde con la Reivindicación 3, en donde dicha molécula objetivo se prepara mediante el cultivo de una línea de células transformadas la cual posee un vector de expresión que contiene un polinucleótido codificador de dicha molécula objetivo en un medio que contiene fuentes asimilables de ^{13}C.

5. El método acorde con la Reivindicación 4, en donde dichas fuentes asimilables de ^{13}C se encuentran uniformemente enriquecidas con ^{13}C.

6. El método acorde con la Reivindicación 5, en donde la glucosa uniformemente marcada con ^{13}C (U-^{13}C-glucosa) se emplea para producir dichas fuentes asimilables de ^{13}C.

7. El método acorde con la Reivindicación 4, en donde dichas fuentes asimilables de ^{13}C se encuentran específicamente enriquecidas con ^{13}C.

8. El método acorde con la Reivindicación 7 en donde el yoduro de metilo enriquecido con ^{13}C es empleado para producir dichas fuentes asimilables de ^{13}C.

9. El método acorde con la Reivindicación 7, en donde dichas fuentes asimilables de ^{13}C son aminoácidos, ó sus sales.

10. El método acorde con la Reivindicación 9, en donde dicho aminoácido se selecciona del grupo conformado por alanina, leucina, isoleucina, y valina.

11. El método acorde con la Reivindicación 8, en donde dichas fuentes asimilables de ^{13}C son precursores biosintéticos de aminoácidos, ó las sales de éstos.

12. El método acorde con la Reivindicación 11, en donde dichos precursores biosintéticos de aminoácidos se seleccionan del grupo conformado por el ácido 4(^{13}C)-butírico y el ácido 4-(^{13}C)-3-(^{13}C)-metilbutírico.

13. Un método para investigar de una mezcla de compuestos cual o cuáles compuestos se ligan a una molécula objetivo pre-seleccionada enriquecida con ^{13}C, método que comprende:

a) generación de un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de dicha molécula objetivo;

b) contacto de dicha molécula objetivo con dicha mezcla de compuestos;

c) generación de un segundo espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de la mezcla del paso (b);

d) comparación entre el primero y segundo espectros.

14. El método acorde con la Reivindicación 13, en donde dicho método comprende adicionalmente:

e) exposición de dicha molécula objetivo individualmente a cada compuesto presente en dicha mezcla cuando el paso d) revele diferencias en los espectros primero y segundo;

f) generación de espectros de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensionales de dicha molécula objetivo que ha sido expuesta a cada compuesto; y

g) comparación de cada uno de los espectros generados en el paso f) versus el primero espectro generado de la molécula objetivo sola.

15. El método acorde con la Reivindicación 14, en donde dicha molécula objetivo se selecciona del grupo conformado por lipoproteínas, fragmentos de lipoproteínas, glicoproteínas, fragmentos de glicoproteínas, proteínas, fragmentos de proteína, polipéptidos, ADN, y ARN.

16. El método acorde con la Reivindicación 15, en donde dicha molécula objetivo se selecciona del grupo conformado por proteínas, fragmentos de proteína, y polipéptidos.

17. El método acorde con la Reivindicación 13, en donde dicha molécula objetivo se encuentra uniformemente enriquecida con ^{13}C.

18. El método acorde con la Reivindicación 13, en donde dicha molécula objetivo se encuentra específicamente enriquecida con ^{13}C.

19. Un método para determinar la constante de disociación para un ligando que se liga a una molécula objetivo pre-seleccionada enriquecida con ^{13}C, método que comprende:

a) generación de un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de dicha molécula objetivo;

b) exposición de dicha molécula objetivo a diversas concentraciones de dicho ligando;

c) generación de un espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional a cada concentración del ligando del paso b);

d) comparación de cada espectro obtenido en la paso (c) versus dicho primero espectro mencionado en el paso (a); y

e) cálculo de la constante de disociación.

20. El método acorde con la Reivindicación 19, en donde dicha molécula objetivo se selecciona del grupo conformado por lipoproteínas, fragmentos de lipoproteínas, glicoproteínas, fragmentos de glicoproteínas, proteínas, fragmentos de proteína, polipéptidos, ADN, y ARN.

Folio remplazado por folio 70.

21. El método acorde con la Reivindicación 20, en donde dicha molécula objetivo se selecciona del grupo conformado por proteínas, fragmentos de proteína, y polipéptidos.

22. El método acorde con la Reivindicación 20, en donde dicha molécula objetivo es uniformemente enriquecida con ^{13}C.

23. El método acorde con la Reivindicación 20, en donde dicha molécula objetivo es uniformemente enriquecida con ^{13}C.

24. Un compuesto identificado mediante el método de investigación de presencia de compuestos -tamizaje- acorde con la Reivindicación 13.

Desistido Folio 64

25. Un método para la determinación de residuos aminoácido específicos en una molécula objetivo pre-seleccionada enriquecida con ^{13}C afectada por el ligamiento de un ligando a dicha molécula objetivo, método que comprende:

a) generación de un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de dicha molécula objetivo, en donde dichos valores de corrimiento químico de las señales de $^{13}C/^{1}H$ en dicho espectro de correlación bidimensional corresponden a por lo menos una ubicación específica conocida de agrupamientos atómicos presentes en dicha molécula objetivo;

b) formación de una mezcla de dicha molécula objetivo con un compuesto ligando conocido ;

c) generación de un segundo espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de la mezcla del paso (b); y

d) comparación entre el primero y segundo espectros.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fesik, Stephen W.
Hajduk, Philip J.

<120> Uso de Resonancia magnética nuclear ^{13}C para detectar el Ligamiento a Biomoléculas Objetivo

<130> 5816.US.P3

<160> 5

<170> FastSEQ para Windows versión 3.0

<210> 1
<211> 174
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Región catalítica de la estromelisina humana 81-256

<400> 1

Phe Arg Tre Phe Pro Gli Ile Pro Lis Trp Arg Lis Tre His Leu Tre
1 5 10 15
Tir Arg Ile Val Asn Tir Tre Pro Asp Leu Pro Lis Asp Ala Val Asp
20 25 30
Ser Ala Val Glu Lis Ala Leu Lis Val Trp Glu Glu Val Tre Pro Leu
35 40 45
Tre Phe Ser Arg Leu Tir Glu Gli Glu Ala Asp Ile Met Ile Ser Phe
50 55 60
Ala Val Arg Glu His Gli Asp Phe Tir Pro Phe Asp Gli Pro Gli Asn
65 70 75 80
Val Leu Ala His Ala Tir Ala Pro Gli Pro Gli Ile Asn Gli Asp Ala
85 90 95

His Phe Asp Asp Asp Glu Gln Trp Tre Lis Asp Tre Tre Gli Tre Asn
100 105 110
Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Ile Gli His Ser Leu Gli Leu Phe
115 120 125
His Ser Ala Asn Tre Glu Ala Leu Met Tir Pro Leu Tir His Ser Leu
130 135 140
Tre Asp Leu Tre Arg Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Asn Gli Ile
145 150 155 160
Gln Ser Leu Tir Gli Pro Pro Pro Asp Ser Pro Glu Tre Pro
165 170

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia del Primer

<400> 2

gaaatgaaga gtcttcaa

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia del Primer

<400> 3

gcgtcccagg ttctggag

<210> 4

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia del Primer

<400> 4

taccatggcc tatccattgg atggagc

<210> 5

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia del Primer

<400> 5

ataggatcct taggtctcag gggagtcagg

---------- ::::: ----------

Convenciones de Aminoácidos:

Ala = alanina	Ile = isoleucina
Arg = arginina	Leu = leucina
Asn = asparagina	Lis = lisina
Asp = ácido aspártico	Met = metionina
Cis = cisteína	Pro = prolina
Phe = fenilalanina	Ser = serina
Gli = glicina	Tre = treonina
Glu = ácido glutámico	Tir = tirosina
Gln = glutamina	Trp = triptófano
His = histidina	Val = valina

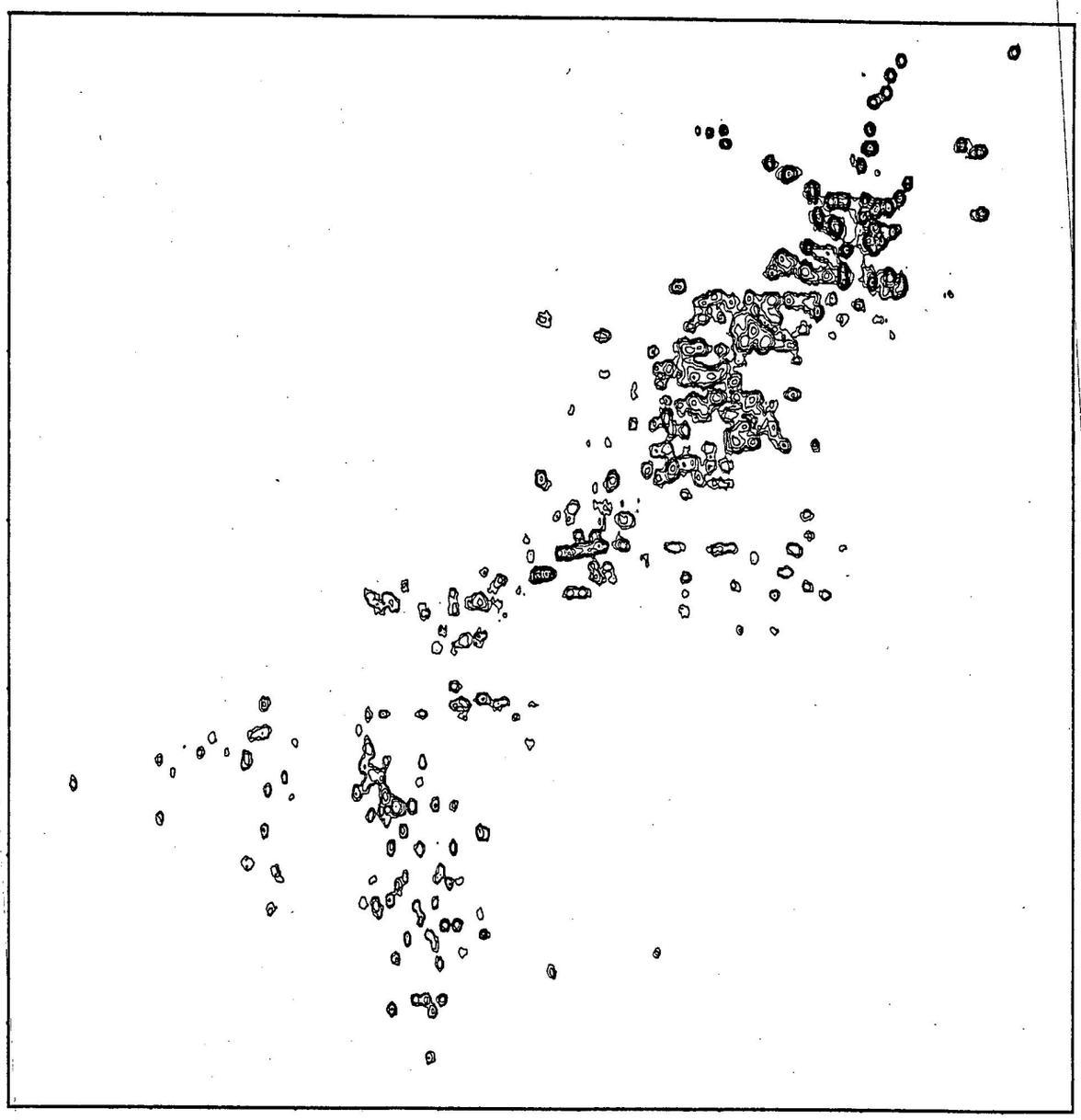


FIG. 1

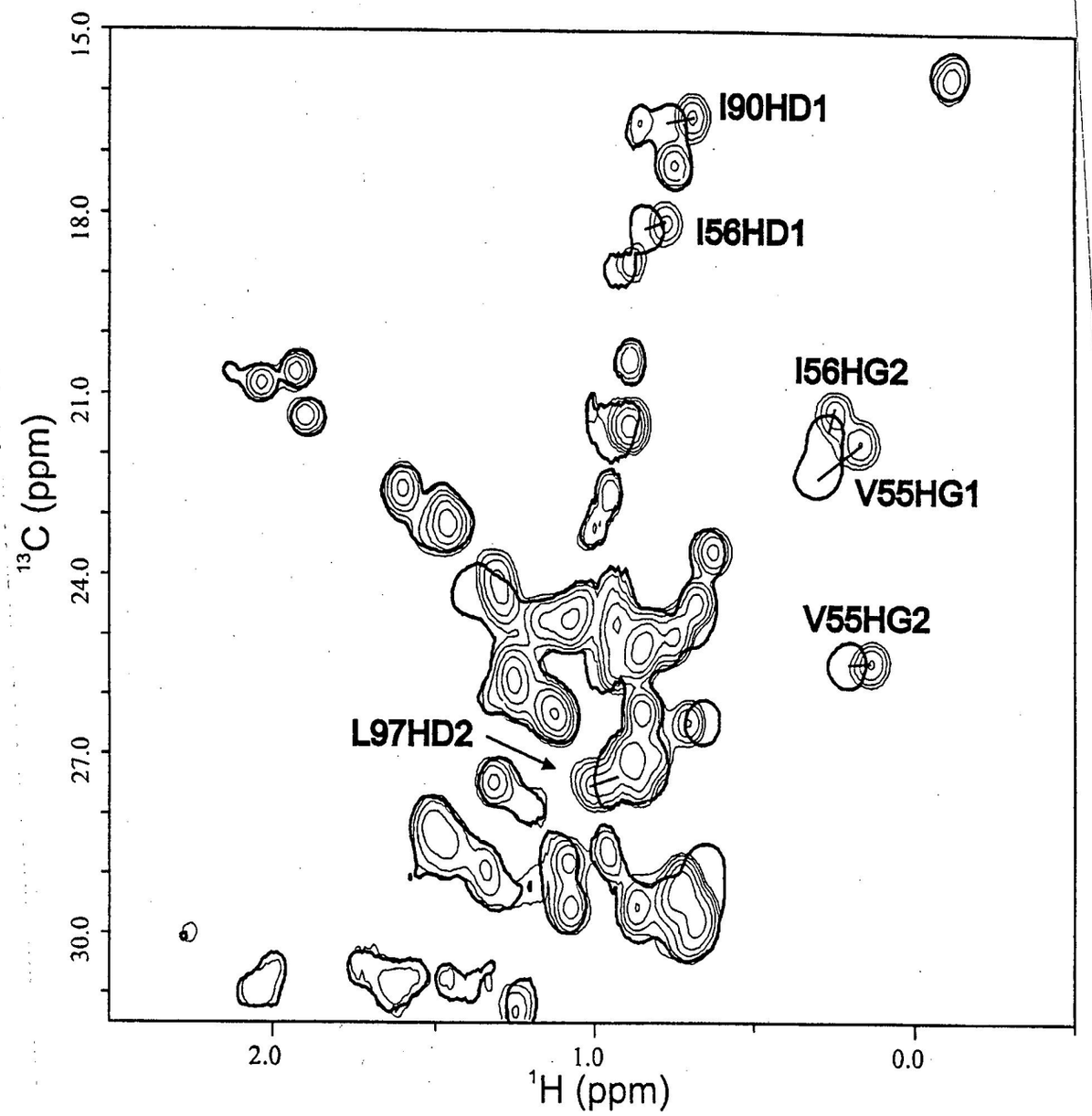

I90HD1
I56HD1
I56HG2
V55HG1
V55HG2
L97HD2
15.0
18.0
21.0
24.0
27.0
30.0
^{13}C (ppm)
2.0
1.0
0.0
^{1}H (ppm)

FIG.2

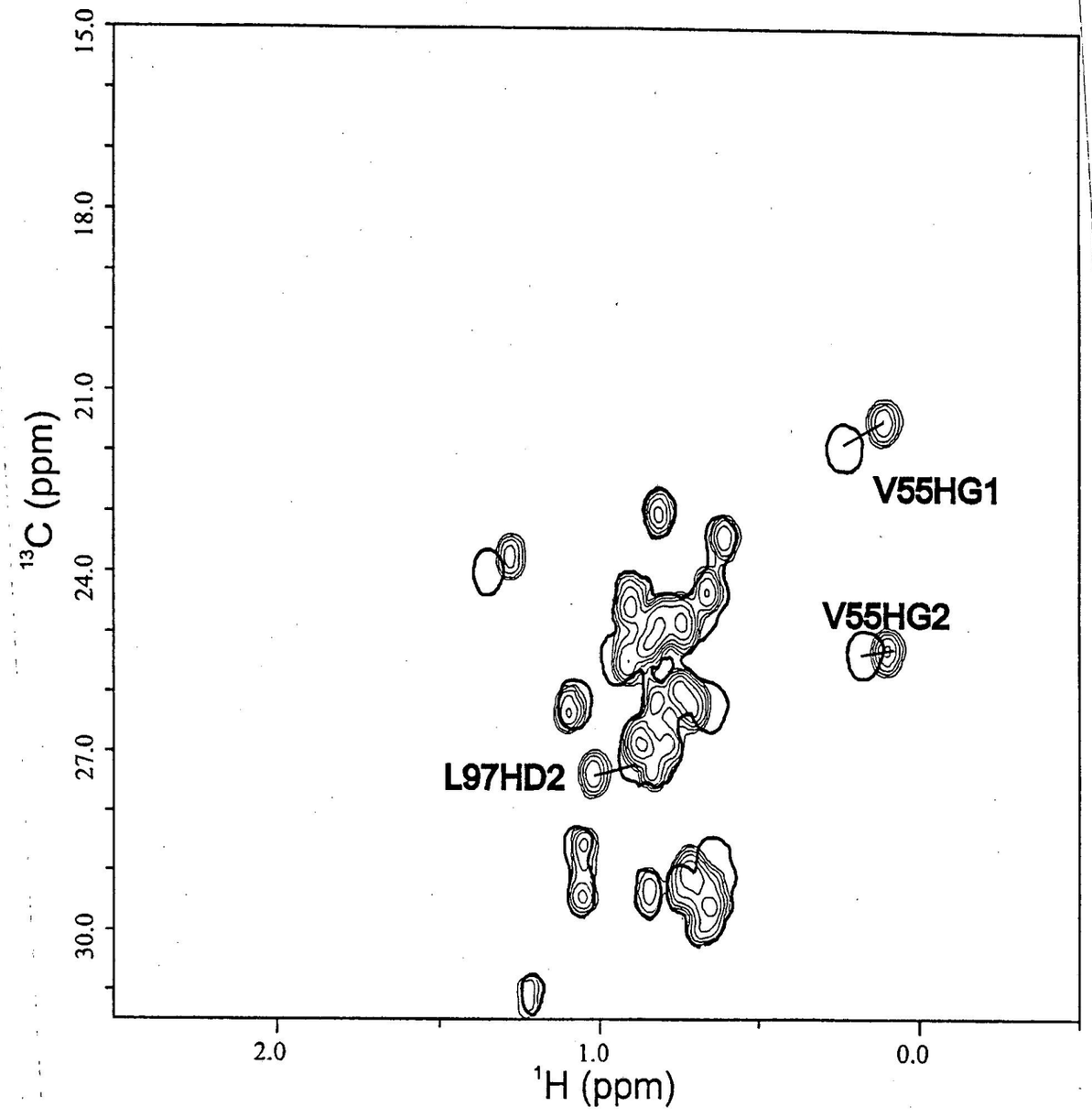

15.0
18.0
21.0
24.0
27.0
30.0
^{13}C (ppm)
V55HG1
V55HG2
L97HD2
2.0
1.0
0.0
^{1}H (ppm)

FIG.3

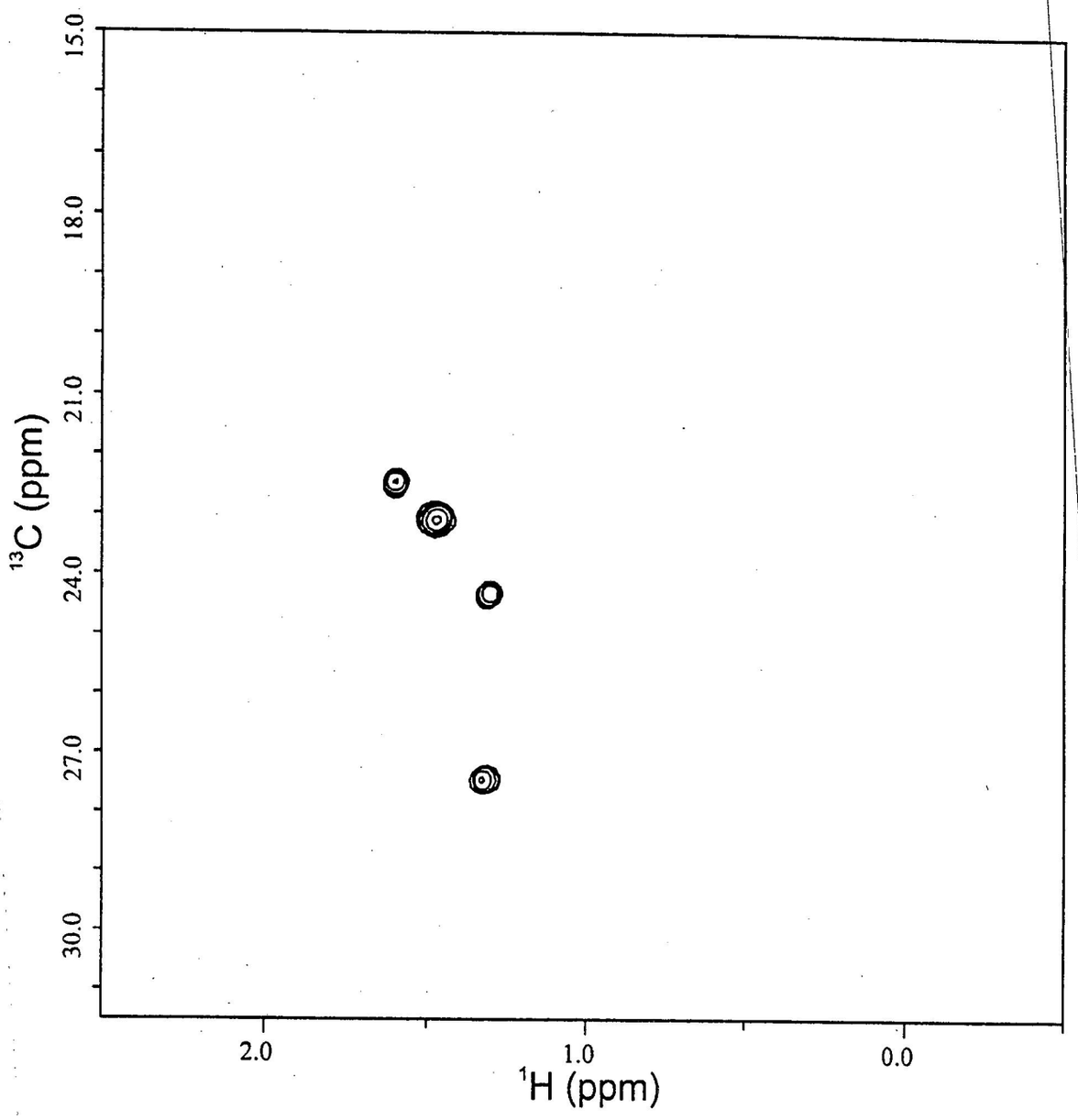


FIG.4

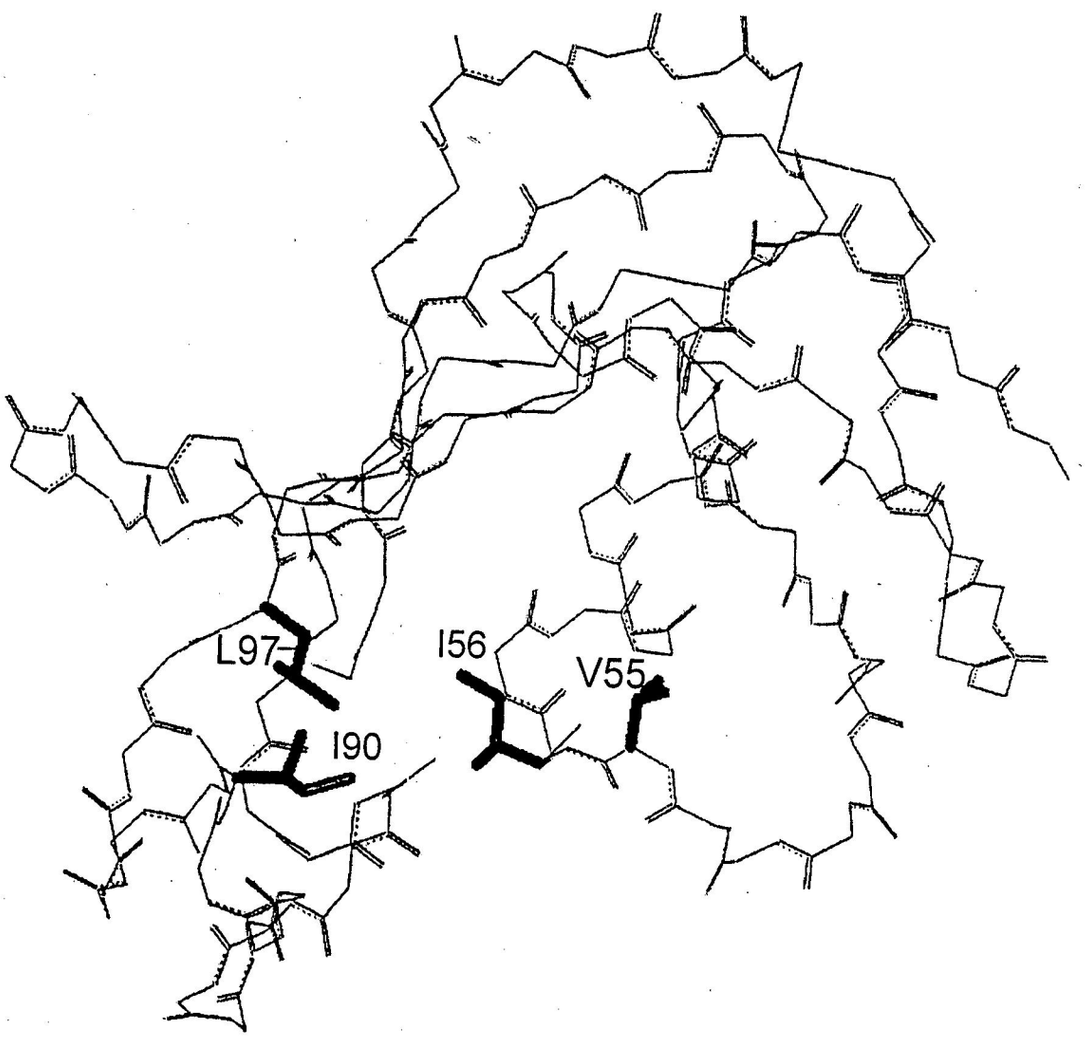


FIG.5

55
50

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: 06-04-00

(71) SOLICITANTE: **ABBOTT LABORATORIES**

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 09/288.924

(72) INVENTOR/ES: Steven W. Fesik y Philip J. Hajduk

(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 09-04-99

(33) PAÍS: US

(74) APODERADO: JOSE ANTONIO LLOREDA

(54) TÍTULO: **" USO DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C PARA DETECTAR EL LIGAMIENTO A MOLÉCULAS OBJETIVO ".**

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Un método para detectar el ligamiento entre un ligando putativo y una molécula objetivo pre-seleccionada enriquecida con ^{13}C, método que comprende:

a) generación de un primer espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de dicha molécula objetivo;

b) formación de una mezcla de dicha molécula objetivo con por lo menos un compuesto ligando putativo;

c) generación de un segundo espectro de correlación RMN $^{13}C/^{1}H$ bidimensional de la mezcla del paso (b); y

d) comparación del primero y segundo espectros.

58
51

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00025248 00000000 Folios: 57
Fecha (AMD): 2000-04-06 17:27:06
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

ia y Comercio
INTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCIÓN [ ] **MODELO DE UTILIDAD [ ]**

- Nombre e identificación del Solicitante [ ]
- Nombre e identificación del Inventor [ ]
- Título o nombre de la Invención [ ]
- Descripción [ ]
- Reivindicaciones [ ]
- Resumen [ ]
- Comprobante de Pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Nombre e identificación del peticionario [ ]
- Nombre e identificación del inventor o diseñador [ ]
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse [ ]
- Representación gráfica [ ]
- Comprobante de pago [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

_____.
Firma Responsable

Fecha:_____.

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5 y 10
Conmutador: 334 12 21-2-3-4
Fax: 281 31 25 e-mail: info@sic.gov.co
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 00-25248

Fecha: 7 de abril del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 19 de octubre de 1987, del folio 54058 al folio 54062 del libro de Protocolo N° 180, obra el poder N° 11.700 conferido por ABBOTT LABORATORIES

domiciliado(a) en Abbott Park - Illinois. E.U.A.

al doctor JOSE LLOREDA CAMACHO y/o ALFONSO LLOREDA CAMACHO y/o JOSE ANTONIO LLOREDA.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los mismos.

Facultad para desistir si.

Revisado

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

2000-04-07

EXPEDIENTE 00-25248

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000).

SI [x] **NO [ ]** **EXTEMPORANEAMENTE [ ]** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [ ] **NO [x]** **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, y traducción del capítulo reivindicatorio, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la perdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [ ] **NO [x]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [ ] **NO [x]** Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 7 de abril del 2000.

EXAMINADOR JURIDICO

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5ª y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

formade.344

Folio 61 54

2000-05-05
430.

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TECNICO 683
EXPEDIENTE 00-25248.
IPC G01N 24/08.

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

SI [X] NO [ ] Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
SI [X] NO [ ] Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
SI [X] NO [ ] Contiene el resumen con el objeto o finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
SI [ ] NO [X] Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).

SI [X] NO [ ] Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
SI [X] NO [ ] Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 /94).
SI [X] NO [ ] Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
SI [ ] NO [X] Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).

SI [X] NO [ ] Contiene el extracto y cumple con los requisitos para publicación (Art.14-c junto con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [-] NO [-] Contiene el arte final del dibujo característico y cumple con los requisitos (Art.14-c junto con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [X] NO [ ] Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI [X] NO [ ] Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).

SI [ ] NO [X] CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS

OBSERVACIONES Y OTROS: SI [X] NO [ ] ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C.,
5 de mayo/2000.

EXAMINADOR TECNICO DE PATENTES
2020

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

55

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO: 683
EXPEDIENTE: 00025248
IPC: G01N 24/08

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. El título de la invención hace referencia al "USO", dado que las reivindicaciones no se tratan sobre el uso sino sobre un método para detectar el ligamiento entre un ligando putativo y una molécula enriquecida con ^{13}C, se recomienda que se modifique el título de manera que corresponda con las reivindicaciones de la solicitud, una posibilidad es que dicho título sea "Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C para detectar el ligamiento de una molécula objetivo y un ligando putativo"

2. Se requiere eliminar la reivindicación 24 toda vez que ella no define el objeto de la invención. No es posible precisar un compuesto por el hecho de que se someta a una prueba y se encuentre que se une a un ligando putativo. El resultado del método que se reivindica podría ser un compuesto conocido e incluso que goce de una protección mediante patente y sin conocer su estructura no sería posible detectarlo pues no ha sido definido. Por ende es imposible caracterizar y precisar el objeto de la invención mediante un método para detectar la capacidad de ligamiento entre el compuesto prueba y un ligando putativo. Adicionalmente, se considera que el concepto inventivo de un método para detectar la unión entre un compuestos prueba y un ligando putativo no guarda ninguna relación y por ende no tiene unidad de invención con un compuesto cuya novedad y nivel inventivo va a depender de su estructura y no del resultado de su análisis mediante una prueba.

Santa Fe de Bogotá, 5 de mayo de 2000.

/202016

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

63
56

EXPEDIENTE 00-25248

2000-05-11
430

AUTO 1020

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor José Antonio Lloreda, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiendo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 19 MAY 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 11 MAY 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI____ NO____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia