



Detección de ligandos asociados a sus moléculas blanco mediante bibliotecas combinatoriales

Curso de Posgrado para el Doctorado en Ciencias Biológicas

Directora del Curso:

- Dra. Clemencia Pinilla. Associate Member, Head of Immunochemistry Department, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, California and Adjunct Associate Professor, Biology Department, San Diego State University.

Coordinadora:

- Dra. Adriana Soutullo; Laboratorio de Inmunología Experimental. FBCB- UNL

Docentes y colaboradores del Curso:

- Dra. Carolina Veaute, Laboratorio de Inmunología Experimental. FBCB-UNL
- Dra. Diana Müller; Departamento de Química Orgánica. FBCB-UNL
- Dr. Álvaro Siano; Departamento de Química Orgánica. FBCB-UNL
- Dra. Verónica Húmpola; Departamento de Química Orgánica. FBCB-UNL
- Dr. Sergio Garay; Departamento de Física. FBCB- UNL
- Lic. Biotec. Ivana Reidel; Laboratorio de Inmunología Experimental. FBCB-UNL

Objetivos del Curso:

- Presentar los principios y usos de bibliotecas combinatoriales para la identificación de ligandos, en contexto de otras metodologías empleadas para su identificación.
- Ejercitar al alumno en la construcción de una biblioteca combinatoria simple así como también una de su interés.
- Discutir en talleres la aplicación de estas bibliotecas combinatoriales, en el marco de ejemplos reales, aplicados al campo inmunológico y detección de ligandos con actividad antimicrobiana o asociado a receptores acoplados a proteína G.
- Interpretar la información obtenida según sea el contexto biológico.

Perfil de los alumnos a quienes está orientado el Curso:

Especialmente dirigido para alumnos de carreras de doctorado o maestría. Podrán asistir docentes, investigadores o profesionales que desempeñen tareas en el ámbito de la biología, inmunología, bioquímica, medicina humana o veterinaria interesados en la temática.

El primer día se permitirá la presencia de los alumnos de grado en las carreras de Bioquímica y de Biotecnología.

Fecha de iniciación y finalización: 16 al 21 de marzo del 2020.



Carga horaria total y distribución horaria de las actividades:

Las actividades se desarrollarán de lunes a sábado en el horario de 8.30 a 13.30 hs.

Carga horaria total: 45 horas, distribuidas en:

- Clases teóricas y Talleres de discusión:30 hs
- Estudio grupal y/o individual del material bibliográfico a discutir:.....15 hs

Número de vacantes:

Día lunes 16 de marzo del 2020, Teórico: Sin límite.

Talleres, días martes a sábado 21 de marzo: 20- 25 alumnos.

En caso de que el número de inscriptos exceda las vacantes disponibles, se realizará una selección que tendrá en cuenta la pertenencia a Carreras Universitarias de Postgrado de la UNL, y de otras universidades, se considerará además la pertinencia de la actividad de los aspirantes y la utilidad que el curso pueda tener para su formación.

Requisitos de formación previa de los inscriptos:

Graduados de las carreras de bioquímica, biotecnología, veterinaria, medicina y carreras afines. Al inscribirse se solicitará una carta de intención donde se exponga los motivos de interés en asistir al curso.

Programa analítico y planificación:

Lunes 16 de marzo del 2020. Principios básicos

8.30- 9.00 hs: *Registro de asistentes inscriptos.*

9.00- 9.30 hs: *Bienvenida de la Dra. Clemencia Pinilla por parte de las autoridades académicas.*

9.30- 10.45 hs: *Principios de la Síntesis de péptidos en Fase sólida, a cargo del Dr. Alvaro Siano y la Dra. Ma. Verónica Húmpola.*

10.45- 11.15 hs: *Coffee Break.*

11.15- 13.00 hs: *Fundamentos en la construcción de bibliotecas combinatoriales y su uso para la identificación de ligandos, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla. Parte 1.*

13.00- 14.00 hs: *Almuerzo*

14.00-16.00 hs: *continuación de Fundamentos en la construcción de bibliotecas combinatoriales y su uso para la identificación de ligandos, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla. Parte 1.*

Martes 17 de marzo del 2020. Principios básicos y aplicaciones.

8.30- 9.30 hs: *Fundamentos en la construcción de bibliotecas combinatoriales, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla. Parte 2.*

9.30- 10.30 hs: *Diseño y Aplicaciones de bibliotecas peptídicas combinatoriales, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

10.30- 11 hs: *Coffee Break*

11.00- 13.30 hs: *Taller con ejercitación para ilustrar la composición de una bibliotecas peptídica combinatorial simple, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*



Miércoles 18 de marzo del 2020. Taller sobre Selección de epitopes B, para fines inmunológicos.

8.30- 9.15 hs: *Predicción de epitopes B in silico, a cargo del Dr Sergio Garay.*

9.15- 10.45 hs: *Taller sobre la caracterización de la especificidad de anticuerpos mediante el empleo de bibliotecas peptídicas combinatoriales, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

10.45- 11.15 hs: *Coffee Break*

11.15- 13.30 hs: *Continuación del Taller sobre la caracterización de la especificidad de anticuerpos mediante el empleo de bibliotecas peptídicas combinatoriales, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

Jueves 19 de marzo del 2020. Taller sobre Selección de epitopes T, para fines inmunológicos.

8.30- 9.15 hs: *Epitopes T y/o B, como inmunógenos candidatos a vacunas, a cargo de las Dra. Carolina Veaute y Adriana Soutullo.*

9.15- 10.45 hs: *Taller sobre la caracterización de la especificidad de células T mediante el empleo de bibliotecas peptídicas combinatoriales, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

10.45- 11.15 hs: *Coffee Break*

11.15- 13.00 hs: *Continuación del Taller sobre la caracterización de la especificidad de células T mediante el empleo de bibliotecas peptídicas combinatoriales, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

Viernes 20 de marzo del 2020. Taller sobre Aplicación de las bibliotecas peptídicas combinatoriales para la identificación de compuestos antimicrobianos

8.30- 10.30 hs: *Taller sobre detección de ligandos con actividad antimicrobiana mediante bibliotecas combinatoriales a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

10.30- 11.00 hs: *Coffee Break*

11.00- 13.00 hs: *Taller sobre la resolución de ligandos como inhibidores enzimáticos mediante bibliotecas combinatoriales a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla*

Sábado 21 de marzo del 2020. Taller sobre Aplicación de las bibliotecas combinatoriales en la identificación de ligandos agonistas o antagonistas, de receptores acoplados a proteína G.

8.30- 10.30 hs: *Introducción a receptores acoplados G y taller sobre la identificación de ligandos de receptores acoplados a proteína G (primera parte), incluyendo opiodes y/o formyl y melanocortina, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

10.30- 11.00 hs: *Coffee Break*

11.00 – 13.30 hs: *Taller sobre la identificación de ligandos de receptores acoplados a proteína G (segunda parte), incluyendo opiodes y/o formyl y melanocortina, a cargo de la Dra. Clemencia Pinilla.*

Bibliografía

Los artículos a trabajar durante los talleres serán enviados vía electrónica, vía correo electrónico y/o por el entorno virtual de la UNL, con debida antelación.

Se adjunta una pre-selección de artículos sugeridos por la Dra. Clemencia Pinilla de modo que los organizadores del curso realicen una selección, previa al dictado del mismo y también en virtud del perfil y cantidad de los alumnos inscriptos.



Material de trabajo:

Los alumnos deberán disponer de una computadora personal, con programa excel.

Metodología didáctica en el desarrollo de los talleres:

La estrategia pedagógica del presente Curso es la modalidad de Taller, donde el trabajo deberá desarrollarse en equipo entre profesores y alumnos, de modo tal que las actividades han de estar enfocadas para dar solución a problemas que presente cada disciplina de conocimiento, que puedan resolverse mediante el análisis de los resultados al escanear las bibliotecas combinatoriales para identificar ligandos.

A los efectos de comprender la “metodología pedagógica” que se ha de implementar en los talleres, el docente en primer término dictara una clase introductoria, de modo de transferir conocimientos para ayudar al estudiante a comprender la bibliografía entregada con anterioridad y a la vez, discutir entre pares y con el docente, los resultados y su interpretación. Para ello, los estudiantes dispondrán de un cuestionario guía y un archivo excel que será entregado por el docente.

Se espera que de este modo el estudiante aprenda interactuando con sus pares y los docentes por medio de un trabajo colaborativo.

Método de evaluación y promoción del curso:

Todos los alumnos, a excepción de los de grado, serán evaluados en cada taller, por el docente a cargo, según sea su nivel de participación, conocimiento y profundidad de su análisis para resolver situaciones problemáticas, mediante preguntas orales.

Cada alumno deberá hacer un trabajo final con un diseño de la biblioteca combinatoria de su interés.

El puntaje mínimo para ser aprobado será 6.

Derecho de Inscripción:

Clase inicial, abierta para toda la comunidad de la FBCB.

Alumnos de las carreras de Doctorado de la FBCB-UNL: \$1600

Alumnos de otras unidades académicas o universidades: \$2600

Profesionales Docentes de la FBCB-UNL: \$ 1500.

Profesionales: \$2600

Financiamiento

No se requiere asistencia financiera ni otros recursos de la Facultad, en virtud que se autofinanciará mediante un S.E.T.

La difusión del curso será realizada a través de la Oficina de Comunicación Institucional de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Bibliografía pre-seleccionada para los talleres del curso

“Detección de ligandos asociados a sus moléculas blanco mediante bibliotecas combinatoriales”.

Elucidación de la especificidad de anticuerpos/Epitopes B:

1. Houghten, R.A., Pinilla, C., Blondelle, S.E., Appel, J.R., Dooley, C.T., Cuervo, J.H. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature*. 354:84-6, 1991.
2. Pinilla, C, Appel, J.R., Blanc, P., Houghten, R.A. Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries. *BioTechniques*. 13:901-5, 1992.
3. Appel, J.R., Pinilla C., Houghten, R.A. Identification of related peptides recognized by a monoclonal antibody using a synthetic peptide combinatorial library. *Immunomethods*. 1:17-23, 1992.
4. Pinilla, C., Appel, J.R., Houghten, R.A. Synthetic peptide combinatorial libraries: the identification of the antigenic determinant of β -endorphin recognized by mAb 3E7. *Gene*. 128:71-6, 1993.
5. Pinilla, C., Buencamino, J., Appel, J.R., Houghten, R.A., Brassard, J.A., Ruggeri, Z.M. Two antipeptide monoclonal antibodies that recognize adhesive sequences in fibrinogen: identification of antigenic determinants and unrelated sequences using synthetic combinatorial libraries. *Biomed Peptides, Proteins & Nucleic Acids*. 1:199-204, 1995.
6. Pinilla, C., Buencamino, J., Appel, J.R., Hopp, T.P., Houghten, R.A. Mapping the detailed specificity of a calcium-dependent antibody through the use of soluble positional scanning combinatorial libraries: identification of potent calcium-independent antigens. *Molecular Diversity*. 1:21-8, 1995.
7. Pinilla, C., Chendra, S., Appel, J.R., Houghten, R.A. Elucidation of monoclonal antibody polyspecificity using a synthetic combinatorial library. *Peptide Res*. 8:250-7, 1995.
8. Appel, J.R., Buencamino, J., Houghten, R.A., Pinilla, C. Exploring antibody polyspecificity using synthetic combinatorial libraries. *Molecular Diversity*. 2:29-34, 1996.
9. Appel, J.R., Muller, S., Benkirane, N., Houghten, R.A., Pinilla, C. Highly specific, cross-reactive sequences recognized by an anti-HBsAg antibody identified from a positional scanning synthetic combinatorial library. *Pept Res*. 9:174-82, 1996.
10. Appel, J.R., Campbell, G.D., Buencamino, J., Houghten, R.A, Pinilla, C. Characterization of antigen-antibody interactions using single substitution analogs and mixture-based synthetic combinatorial libraries. *Journal of Peptide Research*. 52:346-55, 1998.
11. Pinilla, C., Appel, J.R., Campbell, G.D., Buencamino, J., Benkirane, N., Muller, S., Greenspan, N. All-D peptides recognized by an anti-carbohydrate antibody identified from a positional scanning library. *Journal of Molecular Biology*. 283:1013-25, 1998.



Elucidación de la especificidad de células T/Epitopes T:

1. Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S., McFarland, H. F., Houghten, R. A., Simon, R., Pinilla, C., Martin, R. Identification of candidate T cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nature Medicine*. 5:1375-82, 1999.
2. Hemmer, B., Pinilla, C., Gran, B., Vergelli, M., Ling, N., Conlon, P., McFarland, H.F., Houghten, R.A. Martin, R. Contribution of individual amino acids within MHC molecule or antigenic peptide to TCR ligand potency. *J Immunology*. 164:861-71, 2000.
3. Judkowski, V., Pinilla, C., Schroder, K., Tucker, L., Sarvetnick, N., Wilson, D.B. Identification of MHC class II-restricted peptide ligands, including a glutamic acid decarboxylase 65 sequence, that stimulate diabetogenic T cells from transgenic BDC2.5 nonobese diabetic mice. *J Immunology*. 166:908-17, 2001.
4. La Rosa, C., Krishnan, R., Markel, S., Schneck, J.P., Houghten, R.A., Pinilla, C., Diamond, D.J. Enhanced immune activity of cytotoxic T-lymphocyte epitope analogs derived from positional scanning synthetic combinatorial libraries. *Blood*. 97:1776-86, 2001.
5. Pinilla, C., Rubio-Godoy, V., Dutoit, V., Guillaume, P., Simon, R., Zhao, Y., Houghten, R.A., Cerottini, J.C., Romero, P., Valmori, D. Combinatorial Peptide Libraries as an Alternative Approach to the Identification of Ligands for Tumor-reactive Cytolytic T Lymphocytes. *Cancer Research* 61:5153-60, 2001.
6. Zhao, Y., Gran, B., Pinilla, C., Markovic-Plese, S., Hemmer B., Tzou, A., Whitney, L.W., Biddison, W.E., Martin, R., Simon, R. Combinatorial Peptide Libraries and Biometric Score Matrices Permit the Quantitative Analysis of Specific and Degenerate Interactions Between Clonotypic TCR and MHC Peptide. *The Journal of Immunology*. 167:2130-41, 2001.
7. Rubio-Godoy, V., Pinilla, C., Dutoit, V., Borrás, E., Simon, R., Zhao, Y., Cerottini, J.-C., Romero, P., Houghten, R.A., Valmori, D. Toward synthetic combinatorial peptide libraries in positional scanning format PS-SCL based identification of CD8+ tumor reactive T cell ligands: a comparative analysis of PS-SCL recognition by a single tumor-reactive CD8+ CTL clone. *Cancer Research*. 62:2058-63, 2002.
8. Rubio-Godoy, V., Ayyoub, M., Dutoit, V., Servis, C., Schink, A., Rimoldi, D., Romero, P., Cerottini, J.-C., Simon, R., Zhao, Y., Houghten, R.A., Pinilla, C., Valmori, D. Combinatorial peptide library based identification of peptide ligands for tumor-reactive cytolytic T lymphocytes of unknown specificity. *Eur J Immunol*. 32: 2292-9, 2002.
9. Judkowski, V.A., Allicotti, G.M., Sarvetnick, N., Pinilla, C. Peptides from common viral and bacterial pathogens can efficiently activate diabetogenic T-cells. *Diabetes*. 53:2301-9, 2004.
10. Boggiano, C., Moya, R., Pinilla, C., Bihl, F., Brander, C., Sidney, J., Sette, A. Blondelle, S.E. Discovery and characterization of highly immunogenic and broadly recognized mimics of the HIV-1 CTL epitope Gag(77-85). *Eur J Immunol*. 35:1428-37, 2005.
11. Markovic-Plese, S., Hemmer, B., Zhao, Y., Simon, R., Pinilla, C., Martin, R. High level of cross-reactivity in influenza virus hemagglutinin-specific CD4+ T-cell response: implications for the initiation of autoimmune response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 169:31-8, 2005.



12. Sospedra, M., Zhao, Y., zur Hausen, H., Muraro, P., Hamashin, C., de Villiers, E., Pinilla, C., Martin, R. Recognition of conserved amino acid motifs of common viruses and its role in autoimmunity. *PLoS Pathog.* 1:e41, 2005.
13. Lustgarten, J., Dominguez, A.L., Pinilla, C. Identification of cross-reactive peptides using combinatorial libraries circumvents tolerance against Her-2/neu-immunodominant epitope. *J Immunol.* 176:1796-1805, 2006.
14. Sospedra, M., Muraro, P., Stefanova, I., Zhao, Y., Chung, K., Li, Y., Giulianotti, M., Simon, R., Mariuzza, R., Pinilla, C., Martin, R. Redundancy in antigen-presenting function of the HLA-DR and -DQ molecules in the multiple sclerosis-associated HLA-DR2 haplotype. *J Immunol.* 36:1951-61, 2006.
15. Venturini, S., Allicotti, G., Zhao, Y., Simon, R., Burton, D., Pinilla, C., Poignard, P. Identification of peptides from human pathogens able to cross-activate an HIV-1-gag-specific CD4+ T cell clone. *Eur. J Immunol.* 36:27-36, 2006.
16. Lunemann, J.D., Gelderblom, H., Sospedra, M., Quandt, J.A., Pinilla, C., Marques, A., Martin, R. Cerebrospinal Fluid-Infiltrating CD4+T Cells Recognize *Borrelia burgdorferi* Lysine-Enriched Protein Domains and Central Nervous System Autoantigens in Early Lyme Encephalitis. *Infect Immun.* 75(1):243-51, 2007.
17. Sospedra, M., Y. Zhao, M. Giulianotti, R. Simon, C. Pinilla, and R. Martin. 2010. Combining positional scanning peptide libraries, HLA-DR transfectants and bioinformatics to dissect the epitope spectrum of HLA class II cross-restricted CD4+ T cell clones. *J Immunol. Methods* 353:93.
18. Judkowski, V., A. Bunying, F. Ge, J. R. Appel, K. Law, A. Sharma, C. Raja-Gabaglia, P. Norori, R. G. Santos, M. A. Giulianotti, M. K. Slifka, D. C. Douek, B. S. Graham, and C. Pinilla. 2011. GM-CSF Production Allows the Identification of Immunoprevalent Antigens Recognized by Human CD4+ T Cells Following Smallpox Vaccination. *PLoS. ONE.* 6:e24091.
19. Judkowski, V. A., R. G. Santos, A. Bunying, M. A. Giulianotti, J. R. Appel, and C. Pinilla. 2012. Novel T cell driven approach leads to the identification of immunoprevalent antigens. *Procedia in Vaccinology* 6:14.
20. Pinilla, C., J. R. Appel, V. Judkowski, and R. A. Houghten. 2012. Identification of B cell and T cell epitopes using synthetic peptide combinatorial libraries. *Curr Protoc. Immunol* Chapter 9:Unit9.
21. Falta, M. T., C. Pinilla, D. G. Mack, A. N. Tinega, F. Crawford, M. Giulianotti, R. Santos, G. M. Clayton, Y. Wang, X. Zhang, L. A. Maier, P. Marrack, J. W. Kappler, and A. P. Fontenot. 2013. Identification of beryllium-dependent peptides recognized by CD4+ T cells in chronic beryllium disease. *J Exp. Med* 210:1403.
22. Judkowski, V. A., R. G. Santos, G. Acevedo, M. A. Giulianotti, J. R. Appel, S. A. Longhi, K. A. Gomez, and C. Pinilla. 2015. Antigen discovery for the identification of vaccine candidates and biomarkers using a T cell driven approach in combination with positional scanning peptide libraries. *Procedia in Vaccinology* 9:91.
23. Falta, M. T., A. N. Tinega, D. G. Mack, N. A. Bowerman, F. Crawford, J. W. Kappler, C. Pinilla, and A. P. Fontenot. 2016. Metal-specific CD4 T-cell responses induced by beryllium exposure in HLA-DP2 transgenic mice. *Mucosal. Immunol.* 9:218.



24. Acevedo, G. R., S. A. Longhi, A. Bunying, N. Sabri, A. Atienza, M. P. Zago, R. Santos, V. A. Judkowski, C. Pinilla, and K. A. Gomez. 2017. Methodological approach to the ex vivo expansion and detection of T. cruzi-specific T cells from chronic Chagas disease patients. *PLoS One*. 12:e0178380.
25. Jelcic, I., F. Al Nimer, J. Wang, V. Lentsch, R. Planas, I. Jelcic, A. Madjovski, S. Ruhrmann, W. Faigle, K. Frauenknecht, C. Pinilla, R. Santos, C. Hammer, Y. Ortiz, L. Opitz, H. Gronlund, G. Rogler, O. Boyman, R. Reynolds, A. Lutterotti, M. Khademi, T. Olsson, F. Piehl, M. Sospedra, and R. Martin. 2018. Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4(+) T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* 175:1.
26. Planas R, Santos R, Tomas-Ojer P, Cruciani C, Lutterotti A, Faigle W, Schaeren-Wiemers N, Espejo C, Eixarch H, Pinilla C, R. Martin, M. Sospedra. 2018. GDP-L-Fucose synthase as a novel CD4+ T cell-specific autoantigen in DRB3*02:02 multiple sclerosis patients. *Science translational medicine*. 10:eaat4301.

Identificación de compuestos antimicrobianos usando bibliotecas combinatoriales:

1. Houghten, R.A., C. Pinilla, S.E. Blondelle, J.R. Appel, C.T. Dooley, and J.H. Cuervo. 1991. Generation and use of synthetic peptide combinatorial libraries for basic research and drug discovery. *Nature* 354:84-86.
2. Ostresh, J.M., G.M. Husar, S.E. Blondelle, B. Dörner, P.A. Weber, and R.A. Houghten. 1994. "Libraries from libraries": Chemical transformation of combinatorial libraries to extend the range and repertoire of chemical diversity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:11138-11142.
3. Nefzi, A., J.M. Ostresh, and R.A. Houghten. 1997. The current status of heterocyclic combinatorial libraries. *Chem.Rev.* 97:449-472.
4. Houghten, R.A., C. Pinilla, J.R. Appel, S.E. Blondelle, C.T. Dooley, J. Eichler, A. Nefzi, and J.M. Ostresh. 1999. Mixture-based synthetic combinatorial libraries. *J.Med.Chem.* 42:3743-3778.
5. Cassell, G., M. Klemm, C. Pinilla, and A.M. Segall. 2000. Dissection of bacteriophage λ site-specific recombination using synthetic peptide combinatorial libraries. *J.Mol.Biol.* 299:1193-1202.
6. Fujimoto, D.F., C. Pinilla, and A.M. Segall. 2006. New peptide inhibitors of type IB topoisomerases: similarities and differences vis-a-vis inhibitors of tyrosine recombinases. *J Mol Biol.* 363:891-907.
7. Ranjit, D.K., M.C. Rideout, A. Nefzi, J.M. Ostresh, C. Pinilla, and A.M. Segall. 2010. Small molecule functional analogs of peptides that inhibit lambda site-specific recombination and bind Holliday junctions. *Bioorg Med Chem Lett.* 20:4531-4534.
8. Rideout, M.C., J.L. Boldt, G. Vahi-Ferguson, P. Salamon, A. Nefzi, J.M. Ostresh, M.A. Giulianotti, C. Pinilla, and A.M. Segall. 2011. Potent antimicrobial small molecules screened as inhibitors of tyrosine recombinases and Holliday junction-resolving enzymes. *Mol Divers.* 15:989-1005.
9. Dellai, A., J. Appel, A. Bouraoui, S. Croft, and A. Nefzi. 2013. Antimalarial and cytotoxic activities of chiral triamines. *Bioorg Med Chem Lett.* 23:4579-4582.



10. Bionda, N., R.M. Fleeman, I.F.-N. de, M.C. Rodriguez, F. Reffuveille, L.N. Shaw, I. Pastar, S.C. Davis, R.E. Hancock, and P. Cudic. 2016. Identification of novel cyclic lipopeptides from a positional scanning combinatorial library with enhanced antibacterial and antibiofilm activities. *Eur.J Med Chem* 108:354-363.
11. Rohde, K.H., H.A. Michaels, and A. Nefzi. 2016. Synthesis and antitubercular activity of 1,2,4-trisubstitued piperazines. *Bioorg Med Chem Lett.* 26:2206-2209.
12. Sandhaus, S., T. Annamalai, G. Welmaker, R.A. Houghten, C. Paz, P.K. Garcia, A. Andres, G. Narula, F.C. Rodrigues, S. Geden, M. Netherton, R. Gupta, K.H. Rohde, M.A. Giulianotti, and Y.C. Tse-Dinh. 2016. Small-Molecule Inhibitors Targeting Topoisomerase I as Novel Antituberculosis Agents. *Antimicrob.Agents Chemother.* 60:4028-4036.
13. Giulianotti, M.A., B.A. Vesely, A. Azhari, A. Souza, T. LaVoi, R.A. Houghten, D.E. Kyle, and J.W. Leahy. 2017. Identification of a Hit Series of Antileishmanial Compounds through the Use of Mixture-Based Libraries. *ACS medicinal chemistry letters* 8:802-807.
14. Tran, T., K. Chiem, S. Jani, B.A. Arivett, D.L. Lin, R. Lad, V. Jimenez, M.B. Farone, G. Debevec, R. Santos, M. Giulianotti, C. Pinilla, and M.E. Tolmasky. 2018. Identification of a small molecule inhibitor of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type IIb [AAC(6')-IIb] using mixture-based combinatorial libraries. *International journal of antimicrobial agents* S0924-8579(18)30030
15. Perry, D.L., Jr., B.F. Roberts, G. Debevec, H.A. Michaels, D. Chakrabarti, and A. Nefzi. 2019. Identification of Bis-Cyclic Guanidines as Antiplasmodial Compounds from Positional Scanning Mixture-Based Libraries. *Molecules* 24:

Identificación de ligandos de receptores acoplados a proteína G:

1. Dooley, C.T., and R.A. Houghten. 1993. The use of positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries for the rapid determination of opioid receptor ligands. *Life Sci.* 52:1509-1517.
2. Dooley, C.T., N.N. Chung, P.W. Schiller, and R.A. Houghten. 1993. Acetalins: Opioid receptor antagonists determined through the use of synthetic peptide combinatorial libraries. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:10811-10815.
3. Dooley, C.T., P. Ny, J.M. Bidlack, and R.A. Houghten. 1998. Selective ligands for the m, d, and k opioid receptors identified from a single tetrapeptide positional scanning combinatorial library. *J.Biol.Chem.* 273:18848-18856.
4. Pinilla, C., Appel, J.R., Borrás, E., Houghten, R.A. Advances in the use of synthetic combinatorial chemistry: Mixture-based libraries. *Nat Med.* 9:118-22, 2003.
5. Houghten, R.A., Pinilla, C., Giulianotti, M.A., Appel, J.R., Dooley, C.T., Nefzi, A., Ostresh, J.M., Yu, Y., Maggiora, G.M., Medina Franco, J.L., Brunner, D., Schneider, J. Strategies for the use of mixture-based synthetic combinatorial libraries: scaffold ranking, direct testing in vivo, and enhanced deconvolution by computational methods. *J of Comb Chem.* 10(1):3-19, 2008.
6. Reilly, K.J., M.A. Giulianotti, C.T. Dooley, A. Nefzi, J.P. McLaughlin, and R.A. Houghten. 2010. Identification of two novel, potent, low-liability antinociceptive compounds from the direct in vivo screening of a large mixture-based combinatorial library. *AAPS J* 12:318-329.



7. Pinilla, C., B. S. Edwards, J. R. Appel, T. Yates-Gibbins, M. A. Giulianotti, J. L. Medina-Franco, S. M. Young, R. G. Santos, L. A. Sklar, and R. A. Houghten. 2013. Selective agonists and antagonists of formylpeptide receptors: duplex flow cytometry and mixture-based positional scanning libraries. *Mol. Pharmacol.* 84:1.
8. Medina-Franco, J. L., C. Pinilla, J. R. Appel, M. A. Giulianotti, R. G. Santos, A. B. Yongye, B. S. Edwards, L. A. Sklar, and R. A. Houghten. 2013. Scanning structure-activity relationships in combinatorial data sets: Rapid identification of activity-switches. *J. Chem. Inf. Model.* 53:1475.
9. Santos, R. G., J. R. Appel, M. A. Giulianotti, B. S. Edwards, L. A. Sklar, R. A. Houghten, and C. Pinilla. 2013. The mathematics of a successful deconvolution: A quantitative assessment of mixture-based combinatorial libraries screened against two formylpeptide receptors. *Molecules* 18:6408.
10. Haslach, E., H. Huang, M. L. Dirain, G. Debevec, P. Geer, R. G. Santos, M. A. Giulianotti, C. Pinilla, J. R. Appel, S. R. Doering, M. A. Walters, R. A. Houghten, and C. Haskell-Luevano. 2014. Identification of tetrapeptides from a mixture based positional scanning library that can restore nM full agonist function of the L106P, I69T, I102S, A219V, C271Y, and C271R human melanocortin-4 polymorphic receptors (hMC4Rs). *J Med Chem* 57:4615.
11. Doering, S. R., K. T. Freeman, S. M. Schnell, E. M. Haslach, M. Dirain, G. Debevec, P. Geer, R. G. Santos, M. A. Giulianotti, C. Pinilla, J. R. Appel, R. C. Speth, R. A. Houghten, and C. Haskell-Luevano. 2017. Discovery of Mixed Pharmacology Melanocortin-3 Agonists and Melanocortin-4 Receptor Tetrapeptide Antagonist Compounds (TACOs) Based on the Sequence Ac-Xaa1-Arg-(pI)DPhe-Xaa4-NH₂. *J Med Chem* 60:4342.
12. Fleming, K.A., K.T. Freeman, M.D. Powers, R.G. Santos, G. Debevec, M.A. Giulianotti, R.A. Houghten, S.R. Doering, C. Pinilla, and C. Haskell-Luevano. 2019. Discovery of Polypharmacological Melanocortin-3 and -4 Receptor Probes and Identification of a 100-Fold Selective nM MC3R Agonist versus a μ M MC4R Partial Agonist. *Journal of Medicinal Chemistry* 62:2738-2749.