

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 729**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2016 PCT/EP2016/077845**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2017 WO17085116**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2016 E 16795379 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2020 EP 3377905**

54 Título: **Método para la clasificación de la actividad de proteína quinasa**

30 Prioridad:

16.11.2015 GB 201520178

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

27.05.2021

73 Titular/es:

**KINOMICA LIMITED (100.0%)
Biohub Alderley Park, Alderley Edge,
Macclesfield
Cheshire SK10 4TG, GB**

72 Inventor/es:

**CUTILLAS, PEDRO, RODRIGUEZ;
WILKES, EDMUND y
CASADO-IZQUIERDO, PEDRO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 828 729 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la clasificación de la actividad de proteína quinasa

5 Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra y encuentra un uso particular en la cuantificación de la actividad de una proteína quinasa. El método se puede utilizar para determinar el inhibidor más adecuado de una enzima modificadora de proteínas, por ejemplo un inhibidor de quinasa, con el que tratar a un paciente y, por lo tanto, es útil en el campo de la medicina personalizada.

Antecedentes de la invención

Las proteínas quinasas controlan la actividad de las vías de señalización celular que, a su vez, regulan funciones biológicas clave, que incluyen la migración, el metabolismo y la proliferación. Las vías de señalización celular forman redes complejas de reacciones bioquímicas que integran y decodifican señales extracelulares en respuestas celulares apropiadas. La reconstrucción de estas redes y el análisis sistemático de sus propiedades es importante para avanzar en nuestra comprensión molecular de las enfermedades a nivel de sistemas. La importancia de tales vías en la regulación de la biología celular se subraya por el hecho de que las quinasas están desreguladas en una amplia gama de enfermedades; los ejemplos incluyen la quinasa activada AMP (AMPK) en diabetes, la quinasa Janus (JAK) en afecciones autoinflamatorias, GSK3 β en neurodegeneración y Akt en diferentes formas de cáncer.

Hay más de 500 genes de quinasas en los seres humanos, con aproximadamente 200 de estos expresados en una población celular determinada. A pesar de mucha investigación en esta área, faltan métodos para cuantificar la contribución de cada una de estas quinasas al resultado de la señalización global. De hecho, todos los métodos que se utilizan actualmente para cuantificar la señalización (que se basan en espectrometría de masas (MS) o técnicas inmunoquímicas) evalúan la actividad de una vía de señalización determinada en relación con un control o con otra muestra. Por ejemplo, la solicitud anterior de los inventores publicada como el documento WO 2013/132075 se refiere a un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra mediante el análisis de péptidos modificados de diferentes muestras. Esto se denomina análisis de enriquecimiento del sustrato de quinasa (KSEA) y también se divulga en Casado et al., *Science Signaling* 6, rs6 (2013).

Por lo tanto, estos métodos son útiles para investigar cómo se modula la señalización en diferentes condiciones, pero no pueden usarse para clasificar las quinasas en función de cuánto contribuyen a la señalización entre sí dentro de una población celular determinada.

Vojvodic et al., *Current Drug Discovery Technologies* (2014), vol. 10, No. 4, páginas 283-304 describe un enfoque de fosfoproteómica para identificar objetivos candidatos para la vía del inhibidor de quinasa en líneas celulares primarias de tipo linfoma, Daub et al., *Molecular Cell* (2008), vol. 31, No. 3, páginas 438-448 describe cómo el enriquecimiento selectivo de quinasas permite la fosfoproteómica cuantitativa del quinoma a lo largo del ciclo celular. Cutillas et al., *Molecular & Cellular Proteomics* (2007), vol. 6, No. 9, páginas 1560- 1573 describe el perfil cuantitativo de cinco proteomas centrales murinos usando proteómica funcional sin marcaje. El documento WO 2009/054939 describe métodos para clasificar las células cancerosas basándose en la presencia, ausencia o nivel de una tirosina quinasa o una tirosina quinasa fosforilada y también se refiere a métodos para tratar el cáncer usando la clasificación del cáncer.

La incapacidad de las técnicas del estado del arte para clasificar las quinasas dentro de una población celular o tejido basándose en cuánto contribuyen a un fenotipo dado constituye un problema clínico bien conocido. Los inhibidores de quinasas son eficaces para algunos pacientes con cáncer, pero un número significativo de ellos no responde a dichos fármacos. En algunos casos, los marcadores genéticos o de proteínas se utilizan para personalizar las terapias contra el cáncer, pero la precisión de los biomarcadores actuales de las respuestas suele ser baja. Esto dificulta el desarrollo de la medicina personalizada.

La variabilidad de las respuestas de los cánceres a las terapias con quinasas se debe probablemente al hecho de que los cánceres son biológicamente heterogéneos. De hecho, los esfuerzos para identificar un conjunto de quinasas esenciales comúnmente activadas en todos los pacientes con cáncer han revelado en cambio que el cableado de las redes proliferativas de quinasas varía significativamente entre las células tomadas de diferentes pacientes. Por lo tanto, las células cancerosas exhiben una enorme variación en sus requerimientos de quinasas para la proliferación. La consecuencia práctica de esta heterogeneidad es que los pacientes responden a los inhibidores de quinasa en diferentes grados. Por ejemplo, aproximadamente el 50% de los melanomas albergan la mutación V600E en la proteína quinasa BRAF; el 50% de estos respondieron bien al vemurafenib, un inhibidor de BRAF mutado, es decir, una respuesta global del 25%. De manera similar, aproximadamente el 30% de los cánceres de mama tienen mutaciones de PIK3CA, el gen que codifica la isoforma p110 α de PI3K. Un ensayo clínico reciente mostró que aproximadamente el 30% de los pacientes positivos para mutaciones de PIK3CA respondieron a los inhibidores de PI3K de acuerdo con criterios definidos; una respuesta global del 10%. En la actualidad no se sabe por qué los pacientes positivos para una determinada mutación responden de forma variable a la inhibición específica de la

quinasa del objetivo mutado; y la identidad de las vías que impulsan el fenotipo maligno de los tumores sin mutaciones en estos genes tampoco se conoce para la mayoría de los pacientes.

5 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de cuantificar la actividad de enzimas modificadoras de proteínas tales como quinasas dentro de una muestra particular para permitir la determinación de la terapia más adecuada con la que tratar a un paciente.

Sumario de la invención

10 Los presentes inventores han desarrollado dos algoritmos para cuantificar la contribución de enzimas modificadoras de proteínas individuales (tales como proteína quinasas) en una población celular dada para la señalización celular. El resultado de estos algoritmos se puede utilizar para seleccionar racionalmente el inhibidor de señalización celular más apropiado para tratar pacientes individuales. Los resultados de los algoritmos se denominan clasificación de actividad de quinasa (KAR) y "coeficiente de sensibilidad" (SC), respectivamente. El resultado de KAR es un índice de actividad de quinasa que se denomina "puntuación K" (denominado como K en el presente documento). Los aspectos de la invención para los que se busca protección se definen en las reivindicaciones. Las reivindicaciones se refieren a KAR. SC se describe en el presente documento solo como referencia.

20 En el presente documento se describe un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas de la siguiente manera:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j}$$

25 en la que

m = el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
α = la intensidad de los péptidos modificados *i*;
i = cada péptido modificado en la muestra que es un sustrato de dicha enzima modificadora de proteínas;
30 *l* = el número total de péptidos modificados en la muestra;
β = la intensidad de los péptidos modificados *j*; y
j = todos los péptidos modificados en la muestra.

35 También se describe en el presente documento un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de SC para dicha enzima modificadora de proteínas como sigue:

$$SC = -\log_2 \left(\frac{P_{Ci}}{C_i} \cdot IC_{50i} \right)$$

40 en la que *P_{Ci}* = reducción de la proliferación usando inhibidor en *C_i*;
C_i = concentración del inhibidor a la que se mide la proliferación; y
IC_{50i} = *IC₅₀* "in vitro" del inhibidor contra el objetivo primario.

45 Vista alternativamente, la presente divulgación describe un método para determinar el nivel de actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende

- (i) determinar el número total de péptidos modificados en la muestra;
- (ii) determinar la intensidad de los péptidos modificados;
- (iii) determinar el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
- 50 (iv) determinar la intensidad de los péptidos modificados que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas

calculando el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas de la siguiente manera:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j}$$

55 en la que

m = el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
α = la intensidad de los péptidos modificados *i*;
60 *i* = cada péptido modificado en la muestra que es un sustrato de dicha enzima modificadora de proteínas;

l = el número total de péptidos modificados en la muestra;
 β = la intensidad de los péptidos modificados j ; y
 j = todos los péptidos modificados en la muestra.

5 en la que el valor de K es directamente proporcional al nivel de actividad de dicha enzima modificadora de proteínas.

Descripción detallada de la invención

10 De acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona un método para identificar un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas adecuado para tratar a un paciente, que comprende:

(i) calcular el valor de K para cada enzima modificadora de proteínas en una muestra obtenida de dicho paciente usando un método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende ingresar datos cuantitativos de la fosfoproteómica de espectrometría de masas (MS) y calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas de la siguiente manera:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j}$$

en la que

20 m = el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
 α = la intensidad de los péptidos modificados i ;
 i = cada péptido modificado en la muestra que es un sustrato de dicha enzima modificadora de proteínas;
 l = el número total de péptidos modificados en la muestra;
 β = la intensidad de los péptidos modificados j ; y
 25 j = todos los péptidos modificados en la muestra;

(ii) identificar la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ; y
 (iii) seleccionar un inhibidor que se dirija a la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ,

30 en el que la enzima modificadora de proteínas es una proteína quinasa y el paciente padece o se sospecha que padece cáncer.

En una realización, el valor de K se calcula para dicha enzima modificadora de proteínas como sigue:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j} \cdot \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2}$$

35 en la que
 t = el número total de péptidos modificados objetivo conocidos para dicha enzima modificadora de proteínas.

40 El cáncer puede ser leucemia o linfoma. El cáncer puede ser leucemia mieloide aguda (AML). La proteína quinasa puede seleccionarse del grupo que consiste en CDK1, CDK2, ERK1, PAK1, CK2, ATR y PKACA.

45 El método puede comprender además identificar y/o cuantificar péptidos modificados en una primera muestra y una segunda muestra usando espectrometría de masas (MS). La identificación y/o cuantificación de péptidos modificados en una primera muestra y una segunda muestra se puede llevar a cabo utilizando un método que comprende las siguientes etapas:

(a) obtener péptidos de una muestra;
 (b) añadir péptidos modificados de referencia a los péptidos obtenidos en la etapa (a) para producir una mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia;
 (c) llevar a cabo la espectrometría de masas (MS) sobre dicha mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia para obtener datos relacionados con los péptidos en la muestra; y
 (d) comparar los datos relacionados con los péptidos en la muestra con los datos de una base de datos de péptidos modificados usando un programa informático;
 55 en el que la base de datos de péptidos modificados se recopila mediante un método que comprende:

i. obtener péptidos de una muestra;
 ii. enriquecer de péptidos modificados a partir de los péptidos obtenidos en la etapa i;
 60 iii. realizar cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) sobre los péptidos modificados enriquecidos obtenidos en la etapa ii;

- iv. comparar los péptidos modificados detectados en la etapa iii con una base de datos de referencia conocida para identificar los péptidos modificados; y
- v. recopilar datos relacionados con los péptidos modificados identificados en la etapa iv en una base de datos.

5 En una realización, la etapa (b) comprende además enriquecer péptidos modificados a partir de dicha mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia para producir una mezcla de péptidos modificados enriquecidos y la etapa (c) comprende llevar a cabo espectrometría de masas (MS) en dicha mezcla de péptidos modificados enriquecidos para obtener datos relacionados con los péptidos modificados en la muestra. La etapa de enriquecimiento de péptidos modificados se puede realizar mediante cromatografía.

10 La cromatografía puede seleccionarse del grupo que consiste en cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), cromatografía de dióxido de titanio (TiO₂) y cromatografía de dióxido de circonio (ZrO₂). La etapa de enriquecimiento de péptidos modificados se puede llevar a cabo utilizando métodos basados en anticuerpos.

15 Los datos relacionados con los péptidos en la muestra pueden comprender la relación masa/carga (m/z), carga (z) y tiempo de retención relativo de los péptidos.

La etapa iv se puede realizar usando el motor de búsqueda MASCOT. Los datos relacionados con los péptidos modificados identificados en la etapa iv se seleccionan del grupo que consiste en identidad del péptido modificado, relación masa/carga (m/z), carga (z) y tiempo de retención relativo del péptido modificado.

20 La técnica de MS puede utilizar marcadores de isótopos para la cuantificación. La técnica de MS puede utilizar marcaje metabólico (por ejemplo, aminoácidos marcados con isótopos estables en cultivo (SILAC)) o derivatización química (por ejemplo, iTRAQ, ICAT, TMT).

25 En una realización, cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra comprende:

- (i) determinar el número total de péptidos modificados en la muestra;
- (ii) determinar la intensidad de los péptidos modificados;
- 30 (iii) determinar el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
- (iv) determinar la intensidad de los péptidos modificados que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
- (v) calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas de acuerdo con la reivindicación 1,

35 en el que el valor de K es directamente proporcional al nivel de actividad de dicha enzima modificadora de proteínas.

De acuerdo con un segundo aspecto, la invención proporciona un medio legible por ordenador que comprende un código legible por ordenador operable, en uso, para instruir a un ordenador para que realice el método del primer aspecto de la invención.

40 De acuerdo con un tercer aspecto, la invención proporciona un dispositivo que comprende una memoria que tiene un código ejecutable por ordenador almacenado en ella dispuesto para llevar a cabo el método del primer aspecto de la invención, y un procesador dispuesto para ejecutar el código almacenado en la memoria.

45 La presente divulgación se refiere a métodos para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas tal como una proteína quinasa en una muestra. Los métodos se basan en el análisis de péptidos modificados, por ejemplo péptidos fosforilados, que se identifican típicamente usando técnicas basadas en MS.

50 Los métodos descritos en este documento son métodos para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra. La mayoría de las proteínas se modifican de alguna manera mediante la adición de grupos funcionales y tales modificaciones se efectúan mediante enzimas modificadoras de proteínas. Las modificaciones de proteínas que pueden detectarse mediante espectrometría de masas incluyen fosforilación, glicosilación, acetilación, metilación y lipidación. Estas modificaciones de proteínas tienen varias funciones biológicas en la célula. Por lo tanto, los sitios de modificación pueden ser sitios de modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, los sitios de modificación pueden ser sitios de fosforilación, glicosilación, acetilación, metilación y lipidación. Los sitios de modificación son típicamente sitios de modificación de proteínas y/o péptidos. Un sitio de modificación puede ser uno o más residuos de aminoácidos de un péptido o proteína a los que se añade un grupo funcional tal como un grupo fosfato al péptido o proteína. Los grupos funcionales alternativos incluyen carbohidratos, grupos acetilo, grupos metilo y lípidos. Por "enzima modificadora de proteínas" se entiende por lo tanto una enzima que cataliza una reacción que implica la adición de un grupo funcional a una proteína o péptido. Un "péptido modificado" se define en el presente documento como un péptido que se ha modificado mediante la adición o eliminación de un grupo funcional. Una "enzima modificadora de proteínas" se define en el presente documento como una enzima que cataliza una reacción que implica la adición o eliminación de un grupo funcional a una proteína o péptido.

65 Los métodos de la divulgación se pueden aplicar a la cuantificación de la actividad de cualquier enzima modificadora de proteínas cuya actividad se pueda detectar utilizando métodos basados en MS. Tales enzimas incluyen proteína

quinasas (también denominadas en el presente documento como "quinasas"), proteína glicosiltransferasas, proteína acetiltransferasas, proteína metiltransferasas y proteína palmitoiltransferasas. La actividad de estas enzimas da como resultado la fosforilación, acetilación, glicosilación, metilación y lipidación de sustratos de proteínas o péptidos, respectivamente. Todas estas modificaciones de proteínas pueden detectarse mediante espectrometría de masas.

Los métodos de la divulgación se basan en el análisis de péptidos modificados. Los péptidos modificados contienen uno o más aminoácidos que se han modificado, por ejemplo, fosforilados, acetilados, glicosilados, metilados o lipidados, por una enzima modificadora de proteínas. Dichos aminoácidos modificados se denominan en el presente documento como "sitios de modificación". Cuando un péptido modificado es modificado por una enzima particular modificadora de proteínas, se denomina como un "sustrato" de esa enzima. El péptido modificado incluye uno o más aminoácidos que han sido modificados por la enzima modificadora de proteínas.

En un caso, el método de la divulgación es un método para cuantificar la actividad de una proteína quinasa. En este caso, el método se basa en el análisis de péptidos fosforilados. Los péptidos fosforilados contienen uno o más aminoácidos que están fosforilados (es decir, se ha añadido un grupo fosfato (PO₄) a ese aminoácido). Dichos aminoácidos fosforilados se denominan en el presente documento "sitios de fosforilación". Cuando un péptido es fosforilado por una proteína quinasa particular, se le denomina "sustrato" de esa proteína quinasa. En relación con este caso, el término "fosfoproteína" se usa en este documento para hacer referencia a una proteína fosforilada y el término "fosfopéptido" se usa en este documento para hacer referencia a un péptido fosforilado.

Las proteínas quinasas humanas se pueden dividir en varios grupos que incluyen AGC quinasas, por ejemplo, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa B (PKB) (también conocida como Akt), proteína quinasa C (PKC) y proteína quinasa G (PKG); tirosina quinasas; quinasas similares a tirosina-quinasas; proteína quinasas dependientes de calcio/calmodulina; el grupo de la caseína quinasa 1; grupo CMGC, por ejemplo quinasas CDK, MAPK, GSK3 y CLK; y STE, los homólogos de las quinasas de levadura Sterile 7, Sterile 11 y Sterile 20.

Los métodos de la divulgación son métodos para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra. La muestra utilizada en los métodos de la divulgación puede ser cualquier muestra que contenga péptidos. La muestra es típicamente una muestra biológica y, por lo tanto, puede ser cualquier tipo de muestra obtenida de una fuente biológica, por ejemplo, una muestra obtenida de un ser humano, animal, vegetal o bacteriano. Por lo tanto, la divulgación abarca el uso de muestras obtenidas de fuentes humanas y no humanas.

Las muestras utilizadas en los métodos de la presente divulgación pueden ser de cualquier especie de interés. Típicamente, las muestras son de un ser humano o un animal. El animal es típicamente un mamífero, por ejemplo un roedor tal como un ratón, rata o cobaya, o un ungulado tal como una vaca, oveja o cabra. El animal es alternativamente un ave, tal como un pollo, un pez, tal como un pez cebra, un nematodo, tal como el gusano *Caenorhabditis elegans*, o un insecto, tal como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Las muestras utilizadas en los métodos de la divulgación también pueden ser de otras formas de vida tales como bacterias y levaduras. Las muestras utilizadas en los métodos de la divulgación son típicamente muestras de una especie de bacteria importante experimentalmente tal como *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aureus*, o de levadura tal como la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* o la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Las muestras utilizadas en los métodos de la divulgación pueden ser alternativamente de una planta, un hongo o un virus.

La presente divulgación encuentra uso en el campo de la medicina personalizada. Por lo tanto, normalmente, la muestra biológica se deriva de un ser humano y puede ser, por ejemplo, una muestra de un fluido corporal como orina o sangre, u otro tejido. Típicamente, la muestra biológica es una línea celular o un tejido, normalmente un tejido primario. Por ejemplo, la muestra puede ser un tejido de un ser humano o un animal. El ser humano o el animal pueden estar sanos o enfermos. En un caso, el ser humano ha sido diagnosticado o se sospecha que tiene cáncer, por ejemplo, linfoma o leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML). Por consiguiente, el tejido puede ser tejido canceroso. Por ejemplo, la muestra puede ser de un tumor. Alternativamente, la muestra puede ser una línea celular derivada de células humanas o animales sanas o enfermas.

La primera y segunda muestras utilizadas en el método de la divulgación son típicamente o incluyen células de líneas celulares, por ejemplo, una línea celular cancerosa tal como una línea celular de cáncer de mama, por ejemplo una línea celular MCF7. Muchas líneas de células cancerosas se conocen en la técnica y se enumeran en línea, por ejemplo, en la Enciclopedia de líneas celulares de cáncer de Broad-Novartis (CCLE) en <http://www.broadinstitute.org/ccle/home>.

La primera y la segunda muestras son típicamente de la misma línea celular pero pueden ser diferentes. La primera y segunda muestras pueden derivarse de la misma fuente. Por ejemplo, la primera y la segunda muestras pueden ser ambas de un solo individuo. La primera y la segunda muestras pueden ser del mismo tejido. La primera y la segunda muestras pueden ser del mismo fluido corporal.

Se puede hacer referencia a una muestra en el presente documento como una "muestra de prueba" para distinguir la muestra de otra muestra utilizada en un método de la divulgación. Por ejemplo, una muestra puede denominarse muestra de prueba para describir un método que implica una comparación con una muestra de control.

Los métodos de la divulgación son métodos *in vitro* y por lo tanto no comprenden la etapa de obtener una muestra de un organismo tal como un animal.

- 5 Los péptidos modificados pueden modificarse en la muestra. Los péptidos modificados pueden modificarse *in vivo*. Los péptidos modificados pueden ser péptidos modificados endógenos.

10 El método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en este documento, es un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas como sigue:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j}$$

15 El valor de K es la suma de las intensidades de todos los péptidos modificados que se sabe que son sustratos de una enzima modificadora de proteínas dada dividida por la suma de las intensidades de todos los péptidos modificados presentes en una muestra. Como comprenderá el experto en la técnica, la "intensidad" de un péptido corresponde a su abundancia, por ejemplo, en una muestra. Las intensidades se pueden calcular, por ejemplo, usando áreas de pico o altura de cromatogramas a partir de datos de LC-MS.

20 En la fórmula expuesta anteriormente, m = el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de la enzima modificadora de proteínas cuya actividad se está cuantificando; α = la intensidad de los péptidos modificados i , en la que i = cada péptido modificado en la muestra que es un sustrato de dicha enzima modificadora de proteínas; l = el número total de péptidos modificados en la muestra; y β = la intensidad de los péptidos modificados j , en la que j = todos los péptidos modificados en la muestra.

En algunos casos, las intensidades de los péptidos modificados i y j están normalizadas. La normalización se lleva a cabo típicamente en relación con la intensidad total.

30 En algunos casos, se usa un factor de corrección para tener en cuenta el hecho de que algunas quinasas tienen un mayor número de sustratos que otras, y que se conoce más información sobre las relaciones quinasa-sustrato para quinasas más conocidas. En estos casos, el valor de K se calcula para dicha enzima modificadora de proteínas como sigue:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j} \cdot \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2}$$

35 en la que t = el número total de péptidos modificados objetivo conocidos para dicha enzima modificadora de proteínas.

40 Convenientemente, se puede usar un factor de multiplicación para llevar la cifra del valor de K a un nivel más manejable. Por ejemplo, se puede utilizar un factor de multiplicación de 10^2 , 10^4 o 10^6 . Cuando se utiliza un factor de multiplicación de 10^6 , el valor de K se calcula de la siguiente manera:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j} \cdot \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2} \cdot 10^6$$

45 El método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento, implica determinar el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de una enzima modificadora de proteínas en particular. En otras palabras, el método implica determinar el número de péptidos modificados que tienen un sitio de modificación que es modificado por la misma enzima modificadora de proteínas. Por lo tanto, cada uno de estos péptidos modificados tiene al menos un sitio de modificación que es modificado por la misma enzima modificadora de proteínas. Por ejemplo, cuando se analiza la actividad de una proteína quinasa, el método implica determinar el número de péptidos fosforilados que tienen un sitio de fosforilación que está fosforilado por la misma quinasa. En este caso, se sabe que un sitio de fosforilación dentro de cada uno de los péptidos fosforilados está fosforilado por la misma quinasa. De manera similar, si la enzima modificadora de proteínas es una acetilasa, el método implica determinar el número de péptidos modificados que tienen un sitio de acetilación que es acetilado por la misma acetilasa. En este caso, se sabe que un sitio de acetilación dentro de cada uno de los péptidos acetilados está acetilado por la misma acetilasa específica.

La información sobre las relaciones quinasa-sustrato y, por lo tanto, sobre los sitios de fosforilación que son fosforilados por una quinasa particular se puede obtener de bases de datos disponibles públicamente, por ejemplo, PhosphoSite (Hornbeck et al., *Proteomics* 4, 1551 (junio de 2004)), PhosphoSitePlus (<http://www.phosphosite.org/>) y PhosphoElm (Dinkel et al., *Nucleic Acids Res* 39, D261 (enero de 2011)). De manera similar, la información sobre otros sitios de modificación se puede obtener experimentalmente o de bases de datos disponibles públicamente y de artículos de investigación individuales obtenidos de la literatura.

En algunos casos, la propia muestra o el organismo del que se obtiene la muestra se trata con una sustancia de prueba antes de llevar a cabo el método de la divulgación. Por lo tanto, en este caso, una línea celular o un organismo del que se obtiene un tejido se trata con una sustancia de prueba antes de llevar a cabo el método de la divulgación. La sustancia de prueba es típicamente una sustancia química o un fármaco exógeno, tal como inhibidores de moléculas pequeñas, ARNi, péptidos terapéuticos y anticuerpos. Esto permite investigar los efectos de la sustancia de prueba sobre la actividad de una enzima modificadora de proteínas.

Por ejemplo, en un caso, una línea celular puede tratarse con agonistas de vías y/o inhibidores de quinasas antes de llevar a cabo el método de la divulgación. Los inhibidores de quinasa típicos incluyen inhibidores de src y fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), tal como PP2 y PI-103. Otros inhibidores de PI3K incluyen la wortmanina. Al menos 80 inhibidores de quinasas se encuentran en diferentes etapas de desarrollo clínico (Zhang, J. et al., *Nat Rev Cancer* 2009, 9, (1), 28-39). La técnica también es útil para investigar otros tipos de inhibidores que se sospecha que tienen un efecto sobre las vías de las quinasas, tales como inhibidores de HSP90, inhibidores de fosfatasa y fármacos de anticuerpos.

Un "péptido" como se define en el presente documento es una secuencia de aminoácidos corta e incluye oligopéptidos y polipéptidos. Típicamente, tales péptidos tienen entre aproximadamente 5 y 30 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 6 o 7 a 25, 26 o 27 aminoácidos, de 8, 9 o 10 a 20 aminoácidos, de 11 o 12 a 18 aminoácidos o de 14 a 16 aminoácidos, por ejemplo 15 aminoácidos. Sin embargo, también se pueden usar péptidos más cortos y más largos, tales como entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50, por ejemplo, de aproximadamente 3 a aproximadamente 35 o 40 o de aproximadamente 4 a aproximadamente 45 aminoácidos. Típicamente, el péptido es adecuado para análisis espectrométrico de masas, es decir, la longitud del péptido es tal que el péptido es adecuado para análisis espectrométrico de masas. La longitud del péptido que puede analizarse está limitada por la capacidad del espectrómetro de masas para secuenciar péptidos tan largos. En ciertos casos, se pueden analizar polipéptidos de hasta 300 aminoácidos, por ejemplo, de 50 a 250 aminoácidos, de 100 a 200 aminoácidos o de 150 a 175 aminoácidos.

Como se describe en este documento, el método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en este documento, se basa en el análisis de péptidos modificados que se identifican y/o cuantifican en un caso utilizando técnicas basadas en MS. En algunos casos, el método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento, incluye una etapa de identificación y/o cuantificación de péptidos modificados en una muestra usando espectrometría de masas (MS), antes de calcular el valor de K para la enzima modificadora de proteínas de interés. En este caso, la divulgación proporciona un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende identificar y/o cuantificar péptidos modificados mediante espectrometría de masas (MS) y calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas de la siguiente manera:

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j}$$

en la que

m = el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;

α = la intensidad de los péptidos modificados i ;

i = cada péptido modificado en la muestra que es un sustrato de dicha enzima modificadora de proteínas;

l = el número total de péptidos modificados en la muestra;

β = la intensidad de los péptidos modificados j ;

j = todos los péptidos modificados en la muestra.

La identificación y/o cuantificación de péptidos modificados se puede llevar a cabo usando cualquier método adecuado. Típicamente, la identificación y/o cuantificación se puede llevar a cabo mediante cualquier método que implique espectrometría de masas (MS), tal como cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). La LC-MS o LC-MS/MS es típicamente una MS sin marcaje, pero también se pueden usar como base para el análisis técnicas que utilizan el marcaje de isótopos como base para la identificación y/o cuantificación.

En los métodos de la presente divulgación, la identificación y/o cuantificación de una modificación de proteína, tal como la fosforilación, se lleva a cabo típicamente utilizando la técnica TIQUAS (cuantificación dirigida y en profundidad de la señalización), como se describe en el documento WO 2010/119261 (solicitud internacional de patente No.

PCT/GB2010/000770) e incorporada en el presente documento en su totalidad como referencia. Esta técnica permite una cuantificación sensible, rápida y completa de péptidos modificados. El método puede, en un ensayo simple, medir simultáneamente las cantidades de miles de sitios de fosforilación en proteínas. Como se establece en el documento WO 2010/119261, la técnica TIQUAS también se puede usar para cuantificar péptidos modificados distintos de los péptidos fosforilados. De hecho, la técnica TIQUAS puede utilizarse para cuantificar péptidos que contengan modificaciones que puedan detectarse mediante espectrometría de masas.

En este caso del método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en este documento, la etapa de identificar y/o cuantificar péptidos modificados mediante espectrometría de masas (MS) antes de calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas se realiza mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- (a) obtener péptidos de una muestra;
- (b) añadir péptidos modificados de referencia a los péptidos obtenidos en la etapa (a) para producir una mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia;
- (c) llevar a cabo espectrometría de masas (MS) sobre dicha mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia para obtener datos relacionados con los péptidos en la muestra; y
- (d) comparar los datos relacionados con los péptidos de la muestra con los datos de una base de datos de péptidos modificados utilizando un programa informático;

en el que la base de datos de péptidos modificados se recopila mediante un método que comprende:

- i) obtener péptidos de una muestra;
- ii) enriquecer los péptidos modificados a partir de los péptidos obtenidos en la etapa i;
- iii) realizar cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) sobre los péptidos modificados enriquecidos obtenidos en la etapa ii;
- iv) comparar los péptidos modificados detectados en la etapa iii con una base de datos de referencia conocida para identificar los péptidos modificados; y
- v) recopilar datos relacionados con los péptidos modificados identificados en la etapa iv en una base de datos.

En un caso del método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento, en el que la enzima modificadora de proteínas es una proteína quinasa y la modificación es fosforilación, la etapa de identificación y/o cuantificación de péptidos modificados mediante espectrometría de masas (MS) antes de calcular el valor de K para dicha proteína quinasa se realiza mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- (a) obtener péptidos fosforilados de una muestra;
- (b) añadir péptidos fosforilados de referencia a los péptidos obtenidos en la etapa (a) para producir una mezcla de péptidos fosforilados y péptidos fosforilados de referencia;
- (c) llevar a cabo espectrometría de masas (MS) en dicha mezcla de péptidos fosforilados y péptidos fosforilados de referencia para obtener datos relacionados con los péptidos fosforilados en la muestra; y
- (d) comparar los datos relacionados con los péptidos fosforilados en la muestra con datos en una base de datos de péptidos fosforilados usando un programa informático;

en el que la base de datos de péptidos fosforilados se recopila mediante un método que comprende:

- i) obtener péptidos de una muestra;
- ii) enriquecer péptidos fosforilados a partir de los péptidos obtenidos en la etapa i;
- iii) realizar cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) sobre los péptidos fosforilados enriquecidos obtenidos en la etapa ii;
- iv) comparar los péptidos fosforilados detectados en la etapa iii con una base de datos de referencia conocida para identificar los péptidos fosforilados; y
- v) recopilar datos relacionados con los péptidos fosforilados identificados en la etapa iv en una base de datos.

En relación con este caso, el "péptido" de trabajo se usa indistintamente con la palabra "polipéptido".

La etapa (a) de este caso de la divulgación implica la obtención de péptidos de una muestra. Los péptidos pueden obtenerse de la muestra utilizando cualquier método adecuado conocido en la técnica. En un caso, la etapa (a) del método de divulgación comprende:

- (1) lisar células en la muestra;
- (2) extraer las proteínas de las células lisadas obtenidas en la etapa (1); y
- (3) escindir dichas proteínas en péptidos.

En la etapa (1) de esta instancia de la divulgación, las células de la muestra se lisan o se abren. Las células se pueden lisar usando cualquier medio adecuado conocido en la técnica, por ejemplo, usando métodos físicos tales como lisis

mecánica (por ejemplo, usando una licuadora Waring), homogeneización de líquidos, sonicación o lisis manual (por ejemplo, usando un pistilo y mortero) o métodos basados en detergente tales como CHAPS o Tritón-X. Típicamente, las células se lisan usando un tampón desnaturizante, tal como un tampón a base de urea.

5 En la etapa (2) de esta instancia de la divulgación, se extraen proteínas de las células lisadas obtenidas en la etapa (1). En otras palabras, las proteínas se separan de los demás componentes de las células lisadas. En la etapa (3) de esta instancia de la divulgación, las proteínas de las células lisadas se escinden en péptidos. En otras palabras, las proteínas se descomponen en péptidos más cortos. La degradación de proteínas también se conoce comúnmente como digestión. La escisión de proteínas se puede llevar a cabo en la presente divulgación usando cualquier agente
10 adecuado conocido en la técnica.

La escisión o digestión de proteínas se lleva a cabo típicamente usando una proteasa. En la presente divulgación se puede utilizar cualquier proteasa adecuada. En la presente divulgación, la proteasa es típicamente tripsina, quimotripsina, Arg-C, pepsina, V8, Lys-C, Asp-C y/o AspN. Alternativamente, las proteínas se pueden escindir químicamente, por ejemplo usando hidroxilamina, ácido fórmico, bromuro de cianógeno, BNPS-escatol, ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCB) o cualquier otro agente adecuado.

En la etapa (b) de esta instancia, se añaden péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) a los péptidos obtenidos en la etapa (a) para producir una mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia). La etapa (b) da como resultado una mezcla de péptidos (incluidos los modificados, típicamente fosforilados) por muestra. Los péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) también se denominan en el presente documento "estándares internos" (IS). Típicamente, se añaden de 5 a 10, por ejemplo de 6 a 9 o de 7 a 8, péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia).

En la presente divulgación, los péptidos modificados de referencia son típicamente péptidos fosforilados de referencia y se derivan típicamente de una proteína de referencia de naturaleza y concentración definidas, a menudo denominada proteína estándar interno (IS). Los IS pueden ser proteínas disponibles comercialmente, por ejemplo, caseína. Alternativamente, los IS se sintetizan específicamente para su uso en la divulgación. En esta instancia de la divulgación, los péptidos fosforilados de referencia se sintetizan típicamente con la misma secuencia que algunos de los péptidos fosforilados que se desea cuantificar pero que están enriquecidos en isótopos pesados estables de carbono y nitrógeno. Los péptidos se sintetizan típicamente usando química en fase sólida en la que se agrega un aminoácido a la vez para formar una cadena de aminoácidos o polipéptido. Típicamente, dichos péptidos están enriquecidos en ¹³C y ¹⁵N que sustituyen a los ¹²C y ¹⁴N comunes. Este enriquecimiento da como resultado que los péptidos fosforilados de referencia sean aproximadamente de 6 a 10 daltons más pesados que los péptidos fosforilados endógenos con la misma secuencia de modo que puedan distinguirse usando un espectrómetro de masas.

En otra instancia de la divulgación, cuando la enzima modificadora de proteínas es una proteína acetiltransferasa y se están cuantificando péptidos acetilados, los péptidos modificados de referencia son péptidos acetilados de referencia. Dichos péptidos acetilados de referencia son típicamente péptidos sintéticos que contienen aminoácidos acetilados.

Los péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) se añaden típicamente en una cantidad conocida en cada una de las muestras que se van a comparar. Las señales de los péptidos modificados endógenos (típicamente péptidos fosforilados) se normalizan a la señal de los péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) en el análisis posterior.

En una instancia, la etapa (b) de esta instancia comprende además enriquecer péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) a partir de la mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) obtenidos en la etapa (b) para producir una mezcla de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados). Por lo tanto, esta etapa adicional da como resultado una única mezcla de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados) por muestra. En esta instancia de la divulgación, la etapa (c) comprende por tanto llevar a cabo espectrometría de masas (MS) sobre la mezcla de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados) para obtener datos relacionados con los péptidos en la muestra. En esta instancia de la divulgación, la etapa (b) típicamente da como resultado una mezcla de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados).

La etapa de enriquecimiento de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) se lleva a cabo típicamente usando cromatografía. En una instancia, la cromatografía es cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), cromatografía de dióxido de titanio (TiO₂) y/o cromatografía de dióxido de circonio (ZrO₂). Típicamente, la cromatografía es IMAC y cromatografía de TiO₂.

Alternativamente, la etapa de enriquecimiento de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) se lleva a cabo usando métodos basados en anticuerpos.

65 En una instancia de la divulgación, cuando la enzima modificadora de proteínas es una proteína quinasa y los péptidos que se identifican y/o cuantifican son péptidos fosforilados, se unen anticuerpos con afinidad por aminoácidos

fosforilados tales como tirosina, treonina, serina o histidina (inmovilizados) a una matriz sólida. Los péptidos fosforilados se enriquecen con la capacidad de estos anticuerpos para unirse específicamente a péptidos fosforilados. A continuación, los péptidos no fosforilados se eliminan por lavado mientras que los péptidos fosforilados se retienen en las matrices recubiertas de anticuerpo. La elución de péptidos fosforilados del anticuerpo inmovilizado se lleva a cabo típicamente usando disolventes de pH bajo o por cualquier otro método adecuado que desnaturalice la interacción entre el anticuerpo y los péptidos fosforilados.

En otra instancia de la divulgación, cuando la enzima modificadora de proteínas es una proteína acetiltransferasa y los péptidos que se identifican y/o cuantifican son péptidos acetilados, los péptidos acetilados se enriquecen mediante el uso de anticuerpos específicos contra residuos de aminoácidos acetilados. Dichos anticuerpos se unen a una matriz sólida y luego se enriquecen con la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a residuos de aminoácidos acetilados. A continuación, los péptidos no acetilados se eliminan por lavado mientras que los péptidos acetilados se retienen en el anticuerpo inmovilizado.

En la etapa (c) de esta instancia, la espectrometría de masas (MS) se lleva a cabo en la mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) obtenidos en la etapa (b) para obtener datos relacionados con los péptidos en la muestra. Típicamente, estos datos tienen la forma de un archivo de datos MS para la muestra. En una instancia de la divulgación, cuando la etapa (b) de esta instancia comprende además enriquecer péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) a partir de la mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia) obtenidos en la etapa (b) para producir una mezcla de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados), la etapa (c) comprende llevar a cabo espectrometría de masas (MS) en dicha mezcla de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados) para obtener datos relacionados con los péptidos en la muestra, típicamente un archivo de datos de MS para la muestra. Típicamente, la espectrometría de masas es cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). Por lo tanto, la etapa (c) normalmente da como resultado un archivo de datos de LC-MS (uno de cada muestra). Los datos relacionados con los péptidos en la muestra típicamente comprenden la relación masa/carga (m/z), carga (z) y/o tiempo de retención relativo de los péptidos.

En la etapa (d) de esta instancia, los datos relacionados con los péptidos en la muestra (típicamente en forma de un archivo de datos de MS y más típicamente un archivo de datos de LC-MS) se comparan con datos en una base de datos de péptidos modificados (péptidos típicamente fosforilados) utilizando un programa informático. Por ejemplo, la relación masa/carga (m/z), la carga (z) y el tiempo de retención relativo de los péptidos en la muestra se comparan con la relación masa/carga (m/z), la carga (z) y el tiempo de retención relativo de los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en la base de datos. Esto permite la identificación y cuantificación de cada péptido modificado (típicamente péptido fosforilado) en la muestra utilizando la base de datos de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados).

Típicamente, el programa informático es el programa denominado PESCAL (Cutillas, P. R.; Vanhaesebroeck, B. *Mol Cell Proteomics* 6 (9), 1560-73, 2007). PESCAL construye cromatogramas de iones extraídos (XIC, es decir, un perfil de elución) para cada uno de los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) presentes en la base de datos a través de todas las muestras que se van a comparar. Esto se hace centrando los XIC en la m/z y el tiempo de retención del péptido previamente identificado para ser modificado (típicamente fosforilado) (es decir, presente en la base de datos construida en la primera etapa del procedimiento). PESCAL también considera la carga del péptido para ayudar en la correcta asignación de identidad. El programa también calcula la altura del pico y el área bajo la curva de cada XIC. Los datos se normalizan dividiendo la lectura de intensidad (áreas o alturas de los picos) de cada péptido modificado (típicamente péptido fosforilado) que se analiza por aquellos de los péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia).

En este caso, la base de datos de péptidos modificados se recopila mediante un método que comprende las siguientes etapas:

- i) obtener péptidos de una muestra;
- ii) enriquecer los péptidos modificados a partir de los péptidos obtenidos en la etapa i;
- iii) realizar cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) sobre los péptidos modificados enriquecidos obtenidos en la etapa ii;
- iv) comparar los péptidos modificados detectados en la etapa iii con una base de datos de referencia conocida para identificar los péptidos modificados; y
- v) recopilar los datos relacionados con los péptidos modificados identificados en la etapa iv en una base de datos.

Se pueden usar otros programas informáticos y flujos de trabajo, tales como MaxQuant [*Nature Biotechnology* 26, 1367-1372 (2008)] para cuantificar péptidos y estos son compatibles con la presente divulgación. La etapa i de esta instancia implica obtener péptidos de una muestra. Los péptidos pueden obtenerse de la muestra usando cualquier método adecuado conocido en la técnica y como se describe en el presente documento. La muestra de la etapa i puede ser una tercera muestra.

La muestra es típicamente una muestra biológica y, por lo tanto, puede ser cualquier tipo de muestra obtenida de una fuente biológica, como se describió anteriormente. Típicamente, la muestra es una línea celular o un tejido.

En algunas instancias de la divulgación, en la que la muestra usada en la etapa i es una línea celular, la muestra puede tratarse con un inhibidor antes de llevar a cabo la etapa i. El inhibidor puede ser cualquier tipo de inhibidor adecuado. Típicamente, cuando se identifican y/o cuantifican péptidos fosforilados, el inhibidor es un inhibidor de la fosfatasa. El tratamiento con inhibidores de la fosfatasa aumenta la estequiometría de la fosforilación y da como resultado un mayor número de péptidos fosforilados que pueden incluirse en la base de datos. Además, se pueden usar inhibidores de metil transferasa o acetil hidrolasa cuando el propósito es identificar y/o cuantificar péptidos metilados y acetilados, respectivamente.

En una instancia, la etapa i de esta instancia del método de la divulgación comprende:

- (1) lisar células en una muestra;
- (2) extraer las proteínas de las células lisadas obtenidas en la etapa (1); y
- (3) escindir dichas proteínas en péptidos.

Estos aspectos de la divulgación son los descritos anteriormente. Sin embargo, la etapa (3) se lleva a cabo típicamente usando el mismo método que en la etapa (a) descrita anteriormente.

En la etapa ii de esta instancia, los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) se enriquecen a partir de los péptidos obtenidos en la etapa i. Por lo tanto, la etapa ii da como resultado varias fracciones enriquecidas en péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados).

El enriquecimiento de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en la etapa ii se lleva a cabo típicamente usando cromatografía multidimensional. En una instancia, la cromatografía multidimensional se lleva a cabo usando cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio catiónico fuerte (SCX-HPLC), cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de dióxido de titanio (TiO₂). En otra instancia, la cromatografía multidimensional se lleva a cabo utilizando cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico (SAX-HPLC), cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de dióxido de titanio (TiO₂). En estas instancias de la divulgación, las técnicas cromatográficas se llevan a cabo secuencialmente.

Alternativamente, el enriquecimiento de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en la etapa ii se lleva a cabo usando métodos basados en anticuerpos, como se describió anteriormente.

En la etapa iii de esta instancia, se lleva a cabo cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) en los péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados) obtenidos en la etapa ii. En la etapa iv de esta instancia, los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) detectados en la etapa iii se comparan con una base de datos de referencia conocida para identificar los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados). Esta etapa normalmente se lleva a cabo utilizando un motor de búsqueda disponible comercialmente, tal como, pero sin restringirse a, los motores de búsqueda MASCOT, Protein Prospector, Andromeda o Sequest.

En la etapa v de esta instancia, los datos relacionados con los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) identificados en la etapa iv se recopilan en una base de datos. Esta base de datos enumera todos los parámetros necesarios para la cuantificación de péptidos fosforilados en experimentos biológicos posteriores. Típicamente, los datos relacionados con los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) incluyen la identidad de los péptidos modificados (típicamente péptido fosforilado), la relación de masa a carga (m/z), carga y/o tiempo de retención relativo. Esto permite que los datos relacionados con los péptidos de la muestra, normalmente la relación masa/carga (m/z), la carga (z) y el tiempo de retención relativo de los péptidos en la muestra, se comparen con los valores de los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en la base de datos y así permitir la identificación y cuantificación de los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en la muestra.

En esta instancia, no es necesario que la recopilación de la base de datos se lleve a cabo simultáneamente con el método de la divulgación. La recopilación de la base de datos se puede llevar a cabo por separado, antes de que se utilice la técnica TIQUAS en el método de la divulgación para identificar y/o cuantificar el péptido en la muestra.

La base de la técnica TIQUAS es la construcción de una base de datos de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) que pueden detectarse y cuantificarse mediante LC-MS. Esta base de datos enumera todos los parámetros necesarios para la cuantificación de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en experimentos biológicos posteriores, incluida la identidad del péptido modificado (típicamente péptido fosforilado), relación masa/carga (m/z), carga y tiempo de retención relativa. La base de datos se puede construir enriqueciendo péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) usando cromatografía multidimensional (tal como intercambio catiónico fuerte, IMAC y TiO₂). Las fracciones de péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados) pueden analizarse luego mediante LC-MS/MS para la identificación de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados).

El programa informático denominado PESCAL (Cutillas y Vanhaesebroeck, *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 1560-1573 (2007)) automatiza la cuantificación de cada uno de los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) enumerados en la base de datos en procedimientos de LC-MS de péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) tomados de experimentos biológicos. Para estos experimentos biológicos, las proteínas de los lisados celulares se digieren usando tripsina u otras proteasas adecuadas. Los estándares internos de péptidos (tales como fosfopéptidos), que son péptidos modificados de referencia (típicamente péptidos fosforilados de referencia), se enriquecen en cantidades conocidas en todas las muestras que se van a comparar. Los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) en la mezcla de péptidos resultante se enriquecen usando una etapa de extracción con TiO_2 o IMAC simple de realizar. Los péptidos modificados enriquecidos (típicamente péptidos fosforilados) se analizan en un único procedimiento de LC-MS de típicamente, pero sin limitarse a, aproximadamente 120 minutos (ciclo total). Luego, PESCAL construye cromatogramas de iones extraídos (XIC, es decir, un perfil de elución) para cada uno de los péptidos modificados (típicamente péptidos fosforilados) presentes en la base de datos en todas las muestras que se van a comparar. El programa también calcula la altura del pico y el área bajo la curva de cada XIC. Los datos se normalizan dividiendo la lectura de intensidad (áreas o alturas de los picos) de cada analito de péptido modificado (típicamente fosfopéptido) por aquellos de los IS del péptido modificado (típicamente fosfopéptido).

Como alternativa al uso de la técnica TIQUAS, en los métodos de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprenden calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en este documento, la cuantificación de modificaciones tales como la fosforilación también puede llevarse a cabo utilizando técnicas de MS que utilizan marcadores de isótopos para la cuantificación, tales como el marcaje metabólico (por ejemplo, aminoácidos marcados con isótopos estables en cultivo, (SILAC); Olsen, JV et al., *Cell* 127, 635-648 (2006)), y derivatización química (por ejemplo, iTRAQ (Ross, PL; et al., *Mol Cell Proteomics* 2004, 3, (12), 1154-69), ICAT (Gygi, SP et al., *Nat Biotechnol* 17, 994-999 (1999)), técnicas TMT (Dayon L et al., *Anal Chem.* 15 de abril de 2008; 80 (8): 2921-31). En los métodos de la divulgación, las modificaciones de proteínas se pueden cuantificar con técnicas de LC-MS que miden las intensidades de los iones no fragmentados o con técnicas de LC-MS/MS que miden las intensidades de los iones de fragmentos (tales como Monitoreo de la reacción seleccionada (SRM), también llamado monitoreo de reacciones múltiples (MRM)).

El método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento, da como resultado un valor de K para una enzima modificadora de proteínas particular en una muestra. El valor de K para una enzima modificadora de proteínas en particular se puede comparar con el valor de K para otras enzimas modificadoras de proteínas en una muestra para determinar qué enzima modificadora de proteínas es más activa en esa muestra, y cuanto mayor sea el valor de K indica la enzima más activa. Las enzimas modificadoras de proteínas en una muestra particular se pueden clasificar en orden de sus puntuaciones de K para hacer esto. Esto permite seleccionar un inhibidor adecuado con el que tratar a un paciente del que se ha tomado la muestra, en función de la enzima modificadora de proteínas más activa de la muestra, es decir, la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K .

Por consiguiente, también se describe en el presente documento un método para identificar un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas con el que tratar a un paciente, que comprende:

- (i) calcular el valor de K para cada enzima modificadora de proteínas en una muestra tomada de dicho paciente usando el método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento;
- (ii) identificar la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ; y
- (iii) seleccionar un inhibidor que se dirija a la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K .

Este método también se puede usar en combinación con una etapa de tratamiento del paciente o sujeto con el inhibidor seleccionado. Por consiguiente, también se describe en el presente documento un método para tratar a un paciente que lo necesita con un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas, que comprende:

- (i) calcular el valor de K para cada enzima modificadora de proteínas en una muestra tomada de dicho paciente usando el método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento;
- (ii) identificar la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ;
- (iii) seleccionar un inhibidor que se dirija a la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ; y
- (iv) administrar dicho inhibidor a dicho paciente.

El método de tratamiento puede ser de un sujeto humano o animal y la divulgación se extiende igualmente a usos tanto en medicina humana como veterinaria. El inhibidor se administra preferiblemente a un individuo en una "cantidad terapéuticamente eficaz", que es suficiente para mostrar beneficio al individuo y/o mejorar, eliminar o prevenir uno o más síntomas de una enfermedad. Como se usa en el presente documento, "tratamiento" incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un animal humano o no humano, preferiblemente un mamífero, por ejemplo, mamíferos económicamente importantes tales como ganado, ovejas, cabras y cerdos. El tratamiento puede ser con respecto a una condición existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo).

El paciente es un paciente que necesita tratamiento con un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas, tal como un inhibidor de una proteína quinasa. Por ejemplo, el paciente puede padecer o sospechar que padece cáncer, tal como linfoma o leucemia, por ejemplo leucemia mieloide aguda (AML). En este caso, el paciente es tratado típicamente con un inhibidor de una proteína quinasa, típicamente un inhibidor de una proteína quinasa humana seleccionada del grupo que consiste en AGC quinasas, por ejemplo, proteína quinasa A (PKA), proteína quinasa B (PKB) (también conocida como Akt), proteína quinasa C (PKC) y proteína quinasa G (PKG); tirosina quinasas; quinasas similares a tirosina-quinasas; proteína quinasas dependientes de calcio/calmodulina; el grupo de la caseína quinasa 1; Grupo CMGC, por ejemplo quinasas CDK, MAPK, GSK3 y CLK; y STE, los homólogos de las quinasas de levadura Sterile 7, Sterile 11 y Sterile 20. Los inhibidores de quinasas adecuados para su uso de acuerdo con este aspecto de la divulgación incluyen AZD-5438 (CDK2i), GF-109203X (PKCai; Tocris), PF-3758309 (PAKi; Calbiochem), Trametinib (MEKi; Selleckchem), MK-2206 (AKTi; Selleckchem), KU-0063794 (mTORi; Chemdea), TAK 715 (P38ai), PKC-412 (PKC/Fit3i; Tocris), TBB (CK2i), PF-3758309 (PAKi) y C4945 (CK2i).

Las dosis del inhibidor de una enzima modificadora de proteínas para su uso en la presente divulgación pueden variar entre amplios límites, dependiendo de la enfermedad o trastorno a tratar, la edad y condición del individuo a tratar, etc., y un médico determinará en última instancia las dosis apropiadas que se utilizarán.

Esta dosificación puede repetirse tantas veces como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosificación se puede reducir, de acuerdo con la práctica clínica habitual.

Para la administración a mamíferos, y particularmente a seres humanos, se espera que la dosis diaria del agente activo sea de 1 µg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, típicamente alrededor de 10 µg/kg a 1 mg/kg de peso corporal. En cualquier caso, el médico determinará la dosis real que será la más adecuada para un individuo, que dependerá de factores que incluyen la edad, el peso, el sexo y la respuesta del individuo. Las dosis anteriores son ejemplos del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos en los que se necesiten dosis más altas o más bajas, y esto está dentro del alcance de esta descripción.

Los presentes inventores también han ideado un segundo algoritmo para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra. Por consiguiente, también se describe en el presente documento un método para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de SC para dicha enzima modificadora de proteínas como sigue:

$$SC = -\log_2 \left(\frac{P_{C_i}}{C_i} \cdot IC_{50i} \right)$$

en la que P_{C_i} = reducción de la proliferación usando inhibidor en C_i ; C_i = concentración de inhibidor a la que se mide la proliferación; e $IC_{50i} = IC_{50}$ "in vitro" del inhibidor contra el objetivo primario.

El método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de SC para dicha enzima modificadora de proteínas descrita en el presente documento, implica calcular el valor de SC en base a datos farmacológicos obtenidos de experimentos *in vitro* utilizando inhibidores de enzimas modificadoras de proteínas, tales como los inhibidores de la proteína quinasa. Por consiguiente, el "inhibidor" al que se hace referencia en relación con el cuarto aspecto de la divulgación es un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas.

Los experimentos utilizados para proporcionar la información para el cálculo del valor de SC implican determinar los niveles de proliferación celular *in vitro* en una muestra antes y después de añadir un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas. Esto permite la determinación de P_{C_i} , que es la reducción en la proliferación observada usando el inhibidor a una concentración C_i . La proliferación se puede determinar utilizando cualquier método adecuado, por ejemplo el ensayo con cristal violeta, MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)2H-tetrazolio) y Guava ViaCount.

El cálculo del valor de SC también implica la determinación del IC_{50i} , que es el IC_{50} *in vitro* (concentración de inhibidor que reduce la actividad de la enzima modificadora de proteínas en un 50% en ensayos *in vitro*) del inhibidor contra su objetivo principal, es decir, el objetivo principal del inhibidor (ya que algunos inhibidores tienen efectos sobre múltiples enzimas modificadoras de proteínas tal como las quinasas). Los expertos en la técnica conocerán métodos para determinar la IC_{50} . Típicamente, la enzima modificadora de proteínas es una proteína quinasa.

Los métodos descritos para cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprenden calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas, identificar un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas con el que tratar a un paciente y cuantificar la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende calcular el valor de SC para dicha enzima modificadora de proteínas, se implementan típicamente en un ordenador, utilizando un producto de programa informático. El producto de programa informático puede incluir un código informático dispuesto para instruir a un ordenador para que realice las funciones de uno o más de los diversos métodos descritos anteriormente. El programa informático y/o el código para realizar

tales métodos pueden proporcionarse a un aparato, tal como un ordenador, en un medio legible por ordenador o un producto de programa informático. El medio legible por ordenador puede ser transitorio o no transitorio. El medio legible por ordenador podría ser, por ejemplo, un sistema electrónico, magnético, óptico, electromagnético, infrarrojo o semiconductor, o un medio de propagación para la transmisión de datos, por ejemplo, para descargar el código a través de Internet. Alternativamente, el medio legible por ordenador podría tomar la forma de un medio físico legible por ordenador, tal como semiconductores o memoria de estado sólido, cinta magnética, un disquete de ordenador extraíble, una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de solo lectura (ROM), un disco magnético rígido y un disco óptico, tal como un CD-ROM, CD-R/W o DVD.

Un aparato tal como un ordenador puede configurarse de acuerdo con dicho código para realizar uno o más procesos de acuerdo con los diversos métodos descritos en este documento. En una disposición, el aparato comprende un procesador, una memoria y una pantalla. Típicamente, estos se conectan a una estructura de bus central, la pantalla se conecta a través de un adaptador de pantalla. El sistema también puede comprender uno o más dispositivos de entrada (tales como un ratón y/o un teclado) y/o un adaptador de comunicaciones para conectar el aparato a otros aparatos o redes. Tal aparato puede tomar la forma de un sistema de procesamiento de datos. Tal sistema de procesamiento de datos puede ser un sistema distribuido. Por ejemplo, tal sistema de procesamiento de datos puede distribuirse a través de una red.

Como se describe en este documento, los presentes inventores han desarrollado dos algoritmos para cuantificar la contribución de enzimas modificadoras de proteínas individuales tales como quinasas en una población celular dada para la señalización total. Uno de estos algoritmos, que los inventores han denominado clasificación de actividad de quinasa (KAR), produce "puntuaciones de K" y utiliza datos cuantitativos de MS tal como datos cuantitativos de fosfoproteómica de MS como entrada para generar una puntuación que se puede utilizar para clasificar todas las enzimas modificadoras de proteínas tales como quinasas (para las que se conocen sustratos) en función de su actividad. KAR puede representar un enfoque generalizado y basado en principios para seleccionar racionalmente el inhibidor de señalización celular más apropiado para tratar pacientes individuales. Esta idea se basa en datos, discutidos en los Ejemplos de este documento con más detalle, que indican que las puntuaciones de K reflejan fenotipos celulares (es decir, qué tan sensibles son las células a los inhibidores de quinasas). El segundo algoritmo, denominado "análisis de sensibilidad relativa", utiliza datos farmacológicos para derivar "coeficientes de sensibilidad" (SC) que se pueden utilizar para comparar los efectos de los inhibidores de las enzimas modificadoras de proteínas, tales como los inhibidores de quinasas, entre sí dentro de una muestra. Los datos de entrada para los dos algoritmos se obtienen de la espectrometría de masas de proteínas (MS) y experimentos farmacológicos, respectivamente; por lo tanto, los dos métodos son de naturaleza ortogonal.

En una instancia, KAR usa datos fosfoproteómicos basados en MS como entrada. En esta instancia, las puntuaciones de K generadas como resultado son la suma de las intensidades de los péptidos fosforilados que se sabe que son sustratos de una quinasa determinada dividida por la suma de las intensidades de todos los péptidos fosforilados presentes en una muestra multiplicada por un factor de corrección que toma en cuenta que algunas quinasas pueden tener un mayor número de sustratos que otras, y que las bases de datos de relaciones quinasa-sustrato enumeran más sustratos para quinasas más conocidas.

Puntuación de K

$$\text{Puntuación de K} = \frac{a}{b} \times \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2}$$

45

$$a = \sum_{i=1}^m \alpha_i = \begin{array}{l} \text{suma de las intensidades} \\ \text{de los sustratos de los sitios} \\ \text{de fosforilación de la quinasa K;} \end{array}$$

$$b = \sum_{j=1}^l \beta_j = \begin{array}{l} \text{Suma de todas las} \\ \text{intensidades de los} \\ \text{sitios de fosforilación} \end{array}$$

50 m = número de sustratos de quinasa K detectados
t = número de sustratos conocidos de quinasa K

Por consiguiente, el principio de KAR (puntuación de K) se puede ilustrar como a continuación.

55

Puntuación de K (K)
$K = \frac{\sum \alpha_i}{\sum \beta_j} \cdot \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2} \cdot 10^6$
$\sum \alpha_i$ = suma de las intensidades del sustrato para la quinasa K $\sum \beta_j$ = suma de todas las intensidades del sitio de fosforilación m = número de sustratos (de quinasa K) en el conjunto de datos t = número de sustratos conocidos de quinasa K

Las intensidades de los péptidos fosforilados que contienen sitios comúnmente fosforilados por quinasas dadas se suman y normalizan a la suma de todas las intensidades de fosfopéptidos. Los valores resultantes se normalizan adicionalmente al número de sustratos conocidos e identificados por quinasa.

5 Las intensidades de los sitios de fosforilación se pueden determinar mediante MS cuantitativa sin marcaje como en las publicaciones anteriores de los inventores, por ejemplo, la solicitud de patente TIQUAS WO 2010/119261 y los siguientes artículos científicos:

- 10
- Alcolea, M. P., Casado, P., Rodriguez-Prados, J. C., Vanhaesebroeck, B. & Cutillas, P. R. Molecular & cellular proteomics: MCP 11, 453-466, doi:10.1074/mcp.M112.017483 (2012).
 - Casado, P. et al. Genome biology 14, R37, doi:10.1186/gb-2013-14-4-r37 (2013).
 - Casado, P., Bilanges, B., Rajeeve, V., Vanhaesebroeck, B. & Cutillas, P. R. Molecular & cellular proteomics: MCP 13, 836-848, doi:10.1074/mcp.M113.034751 (2014).
- 15
- Casado, P. & Cutillas, P.R. Molecular & cellular proteomics: MCP 10, M110 003079, doi:10.1074/mcp. M110.003079 (2011).
 - Casado, P. et al. Science signaling 6, rs6, doi:10.1126/scisignal.2003573 (2013).
 - Cutillas, P. R., Geering, B., Waterfield, M. D. & Vanhaesebroeck, B. Molecular & cellular proteomics: MCP 4, 1038-1051, doi:10.1074/mcp.M500078-MCP200 (2005).
- 20
- Montoya, A., Beltran, L., Casado, P., Rodriguez-Prados, J. C. & Cutillas, P. R. Methods 54, 370-378, doi: 10.1016/j.ymeth.2011.02.004 (2011).
 - Rajeeve, V., Pearce, W., Cascante, M., Vanhaesebroeck, B. & Cutillas, P. R. The Biochemical journal 450, 619-628, doi:10.1042/BJ20121525 (2013).
 - Rajeeve, V., Vendrell, I., Wilkes, E., Torbett, N. & Cutillas, P. R. Molecular & cellular proteomics : MCP 13, 1457-1470, doi:10.1074/mcp.M113.035204 (2014).
- 25

KAR es conceptualmente diferente al algoritmo publicado previamente por los inventores, denominado análisis de enriquecimiento de sustrato de quinasa (KSEA), que es el tema de la solicitud de patente publicada como el documento WO 2013/132075 y también Casado, P. et al. Science Signaling 6, rs6 (2013). La diferencia es que KSEA compara las actividades de quinasas entre muestras, mientras que KAR compara las actividades de diferentes quinasas entre sí dentro de una muestra. Aunque ambos algoritmos implican vincular las intensidades de los sitios de fosforilación con las quinasas que actúan más adelante, sus resultados son en la práctica diferentes porque KAR se puede usar para clasificar las actividades de quinasas en función de su actividad en las muestras, mientras que KSEA no se puede usar para tal propósito.

35 Mientras probaban y desarrollaban KAR, los inventores plantearon la hipótesis de que el algoritmo, dado que es una medida de la fuerza de la señalización, refleja los fenotipos celulares. Debido a que no hay otros métodos que puedan usarse para comparar la contribución de las quinasas al resultado de la señalización entre sí, probar la precisión de las puntuaciones de K (el resultado de KAR) como una medida de la fuerza de la señalización requiere evaluar si estos valores se correlacionan con los resultados de la señalización. Por lo tanto, los inventores investigaron un método, completamente independiente de la fosfoproteómica basada en MS, para cuantificar y clasificar la contribución de diferentes quinasas a la señalización. La proliferación y la viabilidad celular son resultados relevantes para medir porque son puntos finales clave de la señalización celular que se pueden medir fácilmente.

45 El resultado de este método fue el algoritmo de "análisis de sensibilidad relativa" (RSA), que en un caso deriva "coeficientes de sensibilidad" (SC) para las quinasas dadas. Se basa en la suposición de que los inhibidores farmacológicos contra quinasas reguladoras reducirán la viabilidad/proliferación celular en mayor medida que los inhibidores contra quinasas que contribuyen menos a la señalización. Este es un concepto bien aceptado; sin embargo, el problema de aplicar tal idea es que diferentes inhibidores tienen diferentes afinidades contra sus objetivos, por lo que la medición de los efectos del inhibidor, utilizando conceptos farmacológicos como la concentración de inhibidor que reduce la viabilidad/proliferación en un 50% (IC₅₀), da como resultado valores que reflejan tanto la afinidad de los inhibidores por sus objetivos como la contribución del objetivo a la regulación del proceso biológico bajo investigación. Para tener en cuenta las diferencias en las afinidades, el SC expresa la viabilidad/proliferación celular en función de la concentración del inhibidor utilizado, multiplicado por la IC₅₀ *in vitro* (concentración del inhibidor que reduce la actividad de la quinasa en un 50% en los ensayos de quinasa *in vitro*) de el inhibidor contra su objetivo principal. De esta manera, los inhibidores de quinasas pueden clasificarse en función de la contribución que tienen sus objetivos al

proceso biológico en estudio (en lugar de lo bien que inhiben sus objetivos); por lo tanto, se pueden comparar entre sí.

Coeficiente de sensibilidad, SC

5

$$SC = -\log_2 \left(\frac{P_{C_i}}{C_i} \times IC50_i \right)$$

P_{C_i} = reducción de la proliferación celular a C_i

10 C_i = concentración del inhibidor a la que se mide la proliferación

$IC50_i$ = IC_{50} *in vitro* del inhibidor contra el objetivo principal

En la ecuación anterior, P_{C_i} puede alternativamente denominarse P_c .

15

La $IC50_i$ (o IC_{50i}) también puede definirse como la IC_{50} *in vitro* frente al objetivo primario.

Las ventajas de los métodos de la presente divulgación son las siguientes:

20

- KAR proporciona la cuantificación de la señalización en "unidades absolutas", es decir, el análisis no requiere el análisis de una muestra de control en paralelo; por lo tanto, KAR se puede aplicar al análisis de muestras clínicas.
- KAR y las puntuaciones de K asociadas es una medida predictiva de cuán sensibles serán las células a los inhibidores de la señalización celular, lo que la hace útil en el desarrollo de medicamentos personalizados.
- Todas las actividades de la quinasa y las vías de señalización se miden en un único ensayo que se puede realizar en un período de tiempo clínicamente útil. Esto contrasta con la mayoría de las técnicas inmunoquímicas que miden una única vía por ensayo.
- Los métodos no dependen de la disponibilidad de anticuerpos con suficiente especificidad.
- RSA permite probar la contribución de los inhibidores objetivos a la regulación de la proliferación/viabilidad celular.

25

30

Las características preferidas para el segundo aspecto y posteriores de la invención son las mismas que para el primer aspecto haciendo los cambios necesarios. Se apreciará que todas las realizaciones descritas en este documento se consideran ampliamente aplicables y combinables con todas y cada una de las otras realizaciones consistentes, según sea apropiado.

35

La presente invención se describirá ahora con más detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos, que están presentes solo con fines ilustrativos. En los ejemplos, se hace referencia a una serie de figuras en las que:

40

Figura 1. Reproducibilidad, linealidad y precisión de la determinación de la puntuación de K. (a) El principio de clasificación de actividad de quinasa (KAR, que produce puntuaciones de K). Las intensidades de los péptidos fosforilados que contienen sitios comúnmente fosforilados por quinasas dadas se suman y normalizan a la suma de todas las intensidades de fosfopéptidos. Los valores resultantes se normalizan adicionalmente al número de sustratos conocidos e identificados por quinasa. (b) Diseño experimental para evaluar la naturaleza cuantitativa del algoritmo. (c, d) Reproducibilidad y linealidad de las puntuaciones de K para tres quinasas representativas. (e) Clasificación de quinasas basada en puntuaciones de K en función de las células tratadas con pV. Las tirosina quinasas (mostradas como puntos de datos triangulares) aumentan claramente sus intervalos con base en la puntuación de K en función de los extractos tratados con pV presentes en las muestras.

45

50

Figura 2. Puntuaciones de K en función del tratamiento con EGF o IGF. Los datos de fosfoproteómica en Wilkes et al., PNAS 112, 7719-7724 (2015) se procesaron para el análisis de KAR. Los resultados ilustran que los resultados de KAR (puntuaciones de K) son una medida de la actividad de quinasa ya que estos valores muestran la cinética esperada de la estimulación del factor de crecimiento sobre la actividad de quinasa.

55

Figura 3. La puntuación de K clasifica las actividades quinasas en función de su contribución a la fosforilación celular entre sí. (a) Puntuaciones de K de más de 60 quinasas en ocho líneas celulares hematológicas. Se realizaron experimentos de fosfoproteómica en las líneas celulares nombradas en cuatro ocasiones independientes como se describió previamente y cada una se analizó dos veces por LC-MS/MS. Se muestran las puntuaciones medias de K de las ocho réplicas analíticas. (b) Clasificación de quinasas basada en su contribución a la fosforilación celular total determinada por análisis de KAR.

60

Figura 4. Curvas de respuesta a la dosis de líneas celulares hematológicas tratadas con un panel de inhibidores de quinasa. Las líneas celulares nombradas se trataron con los inhibidores mostrados y se midió la viabilidad usando un ensayo Guava después de 72 h de tratamiento. Los puntos de datos son la media \pm DE (n = 4).

Figura 5. La clasificación de la actividad de quinasa modela la contribución de las actividades quinasa a la viabilidad celular en líneas celulares hematológicas. (a) SC (coeficiente de sensibilidad) de los compuestos mencionados en ocho líneas celulares hematológicas. (b) Frecuencia de los intervalos de inhibidores de quinasa en función de su SC a través de líneas celulares. (c) Asociación entre la actividad de quinasa (medida por KAR, Figura 1) y SC dentro de líneas celulares individuales. Los valores de puntuación de K se muestran como media \pm SEM de cuatro experimentos independientes, cada uno medido por duplicado. r , coeficiente de correlación de Pearson; los valores p se derivaron de los valores r .

Figura 6. Relación entre las puntuaciones de K y la sensibilidad a los inhibidores de quinasa en ocho líneas celulares hematológicas. El análisis de regresión lineal medido a través de 8 líneas celulares muestra que el coeficiente de sensibilidad para 9 fármacos diferentes se asoció significativamente con las puntuaciones de K para sus principales quinasa objetivo.

Figura 7. Modelado de la contribución de la actividad de quinasa a la viabilidad celular de la leucemia mieloide aguda (AML). (a) Distribución de las puntuaciones de K en 45 biopsias de AML primaria. (b) Frecuencia de intervalos de las quinasa nombradas según lo determinado por el análisis de la puntuación de K . (c) Distribución de las IC_{50} y los SC en 36 biopsias de AML tratadas con los inhibidores de quinasa mencionados; P38i, TAK775; CK2i, CX494; trametinib MEKi (inhibe la señalización de MAPK); PAKi, PF-03758309. (d) Asociación entre SC y puntuaciones de K en dos muestras representativas de pacientes con AML y en 36 casos de AML primaria (e). (f, g) Correlación entre las puntuaciones de K para MEK1 y JAK2 y la viabilidad celular en función del tratamiento con MEKi y PKC412, respectivamente.

Figura 8. Curvas de respuesta a la dosis de células de AML primarias tratadas con un panel de inhibidores de quinasa. Las biopsias de AML se obtuvieron del biobanco del Instituto del Cáncer de Barts con consentimiento ético, se trataron con los compuestos mencionados durante 72 h y se midió la viabilidad mediante el ensayo Guava ViaCount. Los puntos de datos son la media \pm DE ($n = 3$).

Figura 9. Los fenotipos de respuesta a fármacos complejos se asocian con diferencias en las actividades de las quinasa. (a) Patrones de respuesta a cinco inhibidores de quinasa en células de AML primaria. La sensibilidad se midió en cinco concentraciones de inhibidor. El mapa de calor muestra la viabilidad a una concentración de 1 μ M (izquierda) y una disminución de la viabilidad en $> 50\%$ se indica mediante recuadros verdes (derecha). Se identificaron un total de 13 grupos basados en las respuestas que podrían clasificarse en cinco grupos de respuesta principales. (b-g) Puntuaciones de K para las quinasa nombradas, o sus proporciones, en los grupos de respuesta. Las puntuaciones de K individuales se normalizaron al promedio de los pacientes. Se muestran la media \pm SEM y los valores individuales dentro de los grupos de respuesta. Los valores p se calcularon mediante una prueba t no apareada frente a los grupos de respuestas 12 u 11 en (c), (d) y (f) y (g) respectivamente.

Figura 10. Modelos de viabilidad celular en un panel de biopsias de AML primaria. Las puntuaciones de K y los coeficientes de sensibilidad se obtuvieron a partir de datos de viabilidad celular y fosfoproteómica, respectivamente, y se compararon en 36 biopsias diferentes de pacientes con AML.

Figura 11. Actividades de quinasa asociadas con patrones de respuestas a inhibidores de quinasa. (a) Las puntuaciones de K se normalizaron al promedio de los grupos de respuesta que se muestran en la Figura 4a del texto principal (promedio de la fila) y se transformaron logarítmicamente. (b) Comparación de puntuaciones de K entre células sensibles a al menos 3 compuestos (Grupos 1-5) con aquellas de células resistentes a todos los compuestos (Grupo 13) que muestran actividades de quinasa aumentadas en células sensibles (fuentes rojas). (c) Comparación de puntuaciones de K entre células sensibles a MEK1i solamente (grupo 12) y aquellas sensibles a CK2i solamente (Grupo 11). (d) Comparación de puntuaciones de K entre células sensibles a CK2i solamente (grupo 11) y aquellas sensibles a PAKi solamente (Grupo 10). (e) Comparación de puntuaciones de K entre células sensibles a MEK1i solamente (grupo 12) y aquellas sensibles a PAKi solamente (Grupo 10).

Ejemplo

Materiales y métodos

Cultivo de células

Las líneas celulares de linfoma de células B y leucemia se mantuvieron de forma rutinaria en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS) y 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (P/S). Las células se mantuvieron a una confluencia de $0,5-2,0 \times 10^6$ células/mL. Las células estromales se cultivaron en medio IMDM (suplementado con FBS al 10% y 100 U/mL de P/S) y se mantuvieron a una confluencia de $2,0-30,0 \times 10^6$ células en matraces de 175 cm². El medio IMDM acondicionado con MS-5 se generó cultivando células estromales en IMDM durante 3 días. Todas las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂.

Células de AML primaria

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado para el almacenamiento de sus células sanguíneas con fines de investigación. Cada procedimiento se realizó de acuerdo con el Comité de Ética de Investigación de la Ciudad y del Este de Londres, como se describió anteriormente (Miraki-Moud, F. et al. *Blood* 125, 4060-4068 (2015)). Todos los estudios cumplen con las reglas del Comité de Revisión y con el protocolo de Helsinki revisado. Se extrajo sangre periférica de pacientes con AML en el Hospital St Bartholomew y se almacenaron células mononucleares, aisladas mediante gradiente de Ficoll seguido de lisis de glóbulos rojos, en N₂ líquido. Los blastos primarios de AML se descongelaron siguiendo procedimientos estándar: brevemente, los viales se descongelaron a 37 °C y se expusieron a 500 µg de ADNasa (Sigma) durante 5 minutos. Se agregaron 10 mL de PBS, suplementado con FBS al 2%, y la suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 5 °C. Las células se resuspendieron en medio IMDM acondicionado con MS-5 y se filtraron usando un filtro de 70 µm (Fisherbrand). El número de células y la viabilidad se determinaron mediante tinción con azul de tripano usando un analizador de viabilidad celular Vi-CELL XR (Beckman Coulter).

Lisis celular y digestión de proteínas

Para cada línea celular, se realizaron 4 réplicas biológicas independientes: se sembraron 10 x 10⁶ células a razón de 0,5 x 10⁶ células/mL y se dejaron durante la noche. Para cada muestra primaria de LMA, se sembraron 10 x 10⁶ células a razón de 1 x 10⁶ células/mL y se dejaron en la incubadora durante 2 h. Las células se recolectaron posteriormente mediante centrifugación, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato enfriada con hielo, suplementada con Na₃VO₄ 1 mM y NaF 1 mM, y se lisaron en 0,2 mL de tampón de lisis de urea enfriado con hielo (urea 8 M en HEPES 20 mM (pH 8,0), suplementado con Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM, Na₂H₂P₂O₇ 1 mM y fosfato de β-glicerol 1 mM). Los lisados se homogeneizaron adicionalmente mediante sonicación y cualquier material insoluble se eliminó mediante centrifugación. La concentración de proteínas se estimó mediante el ensayo de ácido bicinonónico (BCA). Después de normalizar cada condición a una concentración de proteína común (0,5 µg/µL), cada muestra se redujo y se alquiló mediante incubación secuencial con ditiotreitól 10 mM y yodoacetamida 16,6 mM durante 30 min a temperatura ambiente, en la oscuridad. Para la digestión de proteínas, la concentración de urea se redujo a 2 M mediante la adición de HEPES 20 mM (pH 8,0). Luego se añadió tosil-lisina clorometilcetona (TLCK)-tripsina inmovilizada y las muestras se incubaron durante la noche a 37 °C. Las perlas de tripsina se eliminaron por centrifugación y las soluciones de péptido resultantes se desalaron usando cartuchos de extracción en fase sólida OASIS HLB de 1 cc como se describió anteriormente (Montoya, A. et al., *Methods* 54, 370-378 (2011)).

Enriquecimiento de fosfopéptidos

Los péptidos fosforilados se enriquecieron usando TiO₂ (GL Sciences) como se describió previamente (Wilkes, E. H. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, 7719-7724 (2015)). Las soluciones de fosfopéptidos resultantes se congelaron rápidamente, se secaron con un SpeedVac y se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

Análisis de fosfoproteómica por LC-MS/MS

Para las muestras de líneas celulares, cada réplica biológica se analizó dos veces por LC-MS/MS de la siguiente manera: los sedimentos de fosfopéptidos se resuspendieron en 14 µL de TFA al 0,1% y se inyectaron 4,0 µL por réplica técnica en un UPLC Waters NanoACQUITY (Waters, Manchester, RU) acoplado en línea a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap-XL (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se separaron en un gradiente lineal de 100 minutos entre 5 y 35% de ACN en una columna C18 de UPLC ACQUITY BEH130 (15 cm x 75 µm, 1,7 µm, 130 Å) a un caudal de 300 nL/min. Se seleccionaron los cinco iones de carga múltiple más intensos en cada barrido de MS¹ para la fragmentación por disociación inducida por colisión (con la activación de múltiples etapas habilitada). La resolución de MS¹ se fijó en 30.000 FWHM.

Para las muestras de AML primaria, cada réplica técnica (dos por muestra) consistió en una inyección de 3,0 µL en un sistema Dionex Ultimate nRSLC (Thermo Fisher Scientific) acoplado en línea a un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus (QEP) (Thermo Fisher Científico). Las muestras se separaron en un gradiente lineal de 120 min entre 3 y 30% de ACN en una columna C18 de RSLC Acclaim PepMap (25 cm x 75 µm, 2 µm, 100 Å) a un caudal de 300 nL/min. Los veinte iones con carga múltiple más intensos presentes en cada barrido de MS¹ se seleccionaron para la disociación inducida por colisión (HCD) de mayor energía. La resolución de los barridos de MS¹ se estableció en 70.000 FWHM.

Identificación y cuantificación de fosfopéptidos

La identificación de péptidos se realizó comparando datos de MS/MS desisotópicos con las bases de datos de proteínas humanas Uniprot Swissprot (versión de septiembre de 2014, que contiene 20.233 entradas), utilizando la versión 2.4 del servidor Mascot. Mascot Distiller se utilizó para generar listas de picos en el formato genérico de Mascot. Las tolerancias de masa se establecieron en 10 ppm y 600 mmu (XL)/25 mmu (QEP) para los iones precursores y fragmentos, respectivamente. Para los experimentos de fosfoproteómica, las modificaciones variables permitidas fueron: fosfo-Ser, fosfo-Thr, fosfo-Tyr, piro-Glu (terminal N) y oxidación-Met. Los fosfopéptidos identificados de cada una de las muestras se recopilaron y curaron utilizando secuencias de comandos internas. Los iones

fosfopéptidos únicos con una expectativa <0,05 se incluyeron en los análisis posteriores. Las búsquedas en bases de datos de señuelos de Mascot mostraron que con estos ajustes se produce una tasa de descubrimiento falso de ~ 1%. La cuantificación de péptidos se realizó como se describió anteriormente por nuestro grupo (Montoya et al. (2011), citado más arriba; Casado, P. & Cutillas, PR *Molecular & Cellular Proteomics*: MCP 10, M110 003079 (2011); Cutillas, PR & Vanhaesebroeck, B. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 1560-1573 (2007)) y otros (Tsou, CC et al. *Molecular & Cellular Proteomics*: MCP 9, 131-144 (2010); Mann, B. et al. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* : RCM 22, 3823-3834 (2008)). En resumen, se utilizó el software Pescal (escrito en Python v2.7) para obtener áreas de pico de cromatogramas de iones extraídos de cada uno de los iones fosfopéptidos en la base de datos, en todas las muestras que se comparan. Los tiempos de retención de cada ion fosfopéptido, en cada muestra, se predijeron mediante la alineación de los tiempos de retención de los fosfopéptidos comunes utilizando un algoritmo de modelado lineal interno. A continuación, se integraron los picos cromatográficos obtenidos de los cromatogramas de iones extraídos para cada fosfopéptido en cada muestra y se registraron las áreas de los picos. Las tolerancias de masa a carga (m/z) y tiempo de retención (t_R) se establecieron en 7 ppm y 1,5 min, respectivamente.

15 Análisis de enriquecimiento de sustrato de quinasa y clasificación de actividad de quinasa

Se promediaron las réplicas técnicas y luego se normalizaron las áreas de los picos para cada ion fosfopéptido a la suma de las intensidades de los péptidos para cada muestra. El emparejamiento de quinasa-sustrato se realizó sobre estos datos como se informó anteriormente (Casado, P. et al. *Science Signaling* 6, rs6 (2013)) utilizando un script VBA contra la base de datos PhosphoSitePlus (descargado en julio de 2014). La clasificación de la actividad de la quinasa (KAR) se calculó para la quinasa K utilizando la siguiente ecuación (en la que m = el número de sitios de fosforilación en el conjunto de datos coinciden con la quinasa K ; α = la intensidad normalizada del sitio de fosforilación i ; l = el número total de sitios de fosforilación en el conjunto de datos independientemente de cualquier asociación quinasa-sustrato; β = la intensidad normalizada del sitio de fosforilación j ; t = el número total de sitios de fosforilación objetivo conocidos en la base de datos PhosphoSitePlus para la quinasa K). Los datos se visualizaron utilizando Microsoft Excel 2007/2010 o dentro del entorno informático estadístico R (v3.0.0) utilizando una combinación de los paquetes *reshape2* y *ggplot2*.

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j} \cdot \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2} \cdot 10^6$$

30 Tratamiento con pervanadato

Se expusieron células P31/Fuj a pervanadato de sodio 1 mM o se dejaron sin tratar durante 30 min (el pervanadato de sodio se preparó mezclando H_2O_2 al 30% y Na_3VO_4 100 mM pH 8,0 en una relación de 1:100 durante 15 min). A continuación, las células se recogieron y lisaron como se describió anteriormente. Después de la homogeneización y la cuantificación de la proteína, se mezclaron los lisados de células tratadas y no tratadas hasta una concentración final de proteína de 1,0 $\mu g/\mu L$. Las proporciones utilizadas fueron 0%, 25%, 50%, 75% y 100% de extractos tratados con pervanadato con 100%, 75%, 50%, 25% y 0% de extractos no tratados. Posteriormente, las mezclas de proteínas se sometieron a digestión con tripsina y enriquecimiento con fosfopéptidos como se describió anteriormente.

40 Tratamiento con EGF e IGF

Los resultados de KAR se obtuvieron a partir de un metaanálisis del conjunto de datos suplementario 2 en Wilkes et al. (2015), citado más arriba. Brevemente, las células MCF-7 se privaron de alimento durante 24 h, y posteriormente se trataron con 100 ng/mL de EGF o IGF-1 durante 0, 5, 10, 30 o 60 min y se procesaron para el análisis por MS como se describe en Wilkes et al., (2015), citado más arriba. Los puntajes de K se calcularon como se describió anteriormente.

50 Análisis de viabilidad y coeficiente de sensibilidad

Se sembraron líneas celulares en placas de 96 pozos (10.000 células/pozo), se dejaron durante la noche y se trataron con vehículo, o de 1 a 1000 nM de AZD-5438 (CDK2i;), GF-109203X (PKCai; Tocris), PF-3758309 (PAKi; Calbiochem), Trametinib (MEKi; Selleckchem), MK-2206 (AKTi; Selleckchem), KU-0063794 (mTORi; Chemdea) o TAK 715 (P38ai). Las células también se trataron con 0,01 a 10 μM de PKC-412 (PKC/Flt3i; Tocris) o 0,1 a 10 μM de TBB (CK2i; Sigma). Después de 72 h, las células se tiñeron con el reactivo Guava ViaCount (Millipore) según lo indicado por el fabricante y se midió el número de células y la viabilidad usando un instrumento Guava EasyCyte Plus. Las células de AML primaria se descongelaron como se describió anteriormente, se resuspendieron en medio IMDM acondicionado con MS-5, se sembraron en placas de 96 pozos (20.000 células/pozo) y se trataron con vehículo o de 1 a 10000 nM de PF-3758309 (PAKi), PKC412 (Flt3/PKCi), CX4945 (CK2i; Selleckchem), Trametinib (MEKi) y TAK 715 (P38i). Después de 72 h, las células se tiñeron con el reactivo Guava ViaCount y se midió el número de células y la viabilidad. Todos los fármacos se solubilizaron en DMSO y todas las mediciones se realizaron por triplicado. Los datos de citometría de flujo se analizaron usando CytoSoft (v2.5.7). Los valores de IC_{50} se calcularon utilizando Graphpad PRISM (v5.03). El coeficiente de sensibilidad (SC) se calculó usando la siguiente ecuación (en la que P_{Ci} = reducción de la proliferación a C_i , IC_{50i} = IC_{50} "in vitro" contra el objetivo primario y C_i = concentración de inhibidor a la que se mide la proliferación).

Los datos se visualizaron utilizando Microsoft Excel 2007/2010 o dentro del entorno informático estadístico R (v3.0.0), utilizando una combinación de los paquetes *reshape2* y *ggplot2*.

$$SC = -\log_2\left(\frac{P_{Ci}}{C_i} \cdot IC_{50i}\right)$$

5 Resultados

Linealidad y reproducibilidad de la cuantificación de la señalización mediante la clasificación de actividad de quinasa

10 En primer lugar, se investigó la reproducibilidad y la naturaleza cuantitativa de la clasificación de actividad de quinasa (KAR, que produce puntuaciones de *K*) como una medida de la actividad de quinasa neta. Para ello, la línea celular DHL6 se trató con pervanadato de sodio (pV) y después de la lisis se mezcló con lisados de células sin tratar en diferentes proporciones (Figura 1b). Para probar la reproducibilidad del análisis, se realizó este experimento en tres ocasiones independientes y cada una se analizó por triplicado analítico. Como era de esperar, pV, un inhibidor de la

15 tirosina fosfatasa, indujo un aumento en la puntuación de *K* de las tirosina quinastas; que consecuentemente se clasificó más alto en las muestras en función de las células tratadas con pV (Figura 1c-e). Por tanto, estos datos muestran que las puntuaciones de *K* son lecturas cuantitativas de grupos de sustrato de quinasa y sugieren que estos valores pueden usarse para clasificar las quinastas basándose en su estado de activación de una manera reproducible. También se realizó un meta-análisis de datos fosfoproteómicos publicados obtenidos de experimentos de evolución temporal de

20 células tratadas con EGF o IGF (Wilkes et al. (2015), citano más arriba). Se observó que las puntuaciones de *K* para serina/treonina y tirosina quinastas cambiaron tras el tratamiento con estos factores de crecimiento con la cinética esperada (Figura 2) que indica que los resultados de KAR (puntuaciones de *K*) reflejan verdaderamente las actividades quinastas esperadas.

25 La clasificación de la actividad de quinasa (KAR) modela la contribución de las actividades de la quinasa a la viabilidad celular en líneas celulares hematológicas

A continuación, se analizaron ocho líneas celulares de cáncer hematológico y se clasificaron > 100 quinastas en función de su activación entre sí. La Figura 3a muestra las 60 quinastas con mayores puntuaciones de *K*, siendo CDK1, CDK2, ERK1, PAK1 y CK2 las más altas (Figura 3b).

35 Para investigar si las puntuaciones de *K* reflejaban la contribución de las quinastas a la viabilidad celular, se razonó que si las quinastas con puntuaciones de *K* altas contribuían más a la supervivencia celular que aquellas con puntuaciones de *K* más bajas, debería existir una correlación entre las puntuaciones de *K* de quinastas individuales y el impacto de su inhibición sobre la viabilidad celular. Por lo tanto, se midió la viabilidad celular de nuestro panel de

40 ocho líneas celulares en función del tratamiento con nueve inhibidores de quinasa (las curvas de dosis-respuesta se muestran en la Figura 4). Para valorar la inhibición enzimática de forma aguda, se optó por utilizar inhibidores farmacológicos (en contraposición a medios genéticos). Sin embargo, el efecto de los inhibidores de moléculas pequeñas sobre el comportamiento celular depende tanto de la contribución del objetivo al flujo de la vía como de la afinidad del compuesto por el objetivo (que se refleja en la *IC*₅₀ *in vitro*). Para tener en cuenta esto, se normalizó la inhibición de la viabilidad celular inducida por fármacos mediante la *IC*₅₀ *in vitro* del compuesto contra sus objetivos conocidos. Se denominó a este valor el "coeficiente de sensibilidad" (SC), que se calculó como se define en el presente

45 documento. Al hacer esto, se normalizaron las diferencias en las potencias de los inhibidores, y los inhibidores de quinasa con valores de *IC*₅₀ *in vitro* dispares se pudieron clasificar entre sí en función de la contribución de sus objetivos a la viabilidad celular.

Tabla 1 - Se trató un panel de líneas celulares hematológicas con los compuestos mencionados y se midió su viabilidad después de 48 horas usando el ensayo Guava Viacount.

Ref.	Nombre	Objetivos
CDK2i	AZD5438	CDK1, CDK2, CDK9, GSK3B
PKCai	GF109203X	PKCA, CDK2
MEK1i	GSK1120212	MEK1
mTORCi	KU-0063794	mTORC1, mTORC2
PAKi	PF03758309	PAK1, PAK4, AMPK
PKC/Flt3	PKC412	PKC, Flt3, Kit
P38ai	TAK715	P38A
CK2i	TBB	CK2A1
Akti	MK2206	Akt1, Akt2

La clasificación de los inhibidores de quinasa mostrados en la Tabla 1 en base a sus SC demostró que CDK2i y PAKi se clasificaron como las más altas y, en general, las frecuencias de clasificación reflejaron las obtenidas mediante KAR (Figura 5a, b). Cabe señalar que el inhibidor de PKC α (PKC α i) también inhibe CDK2 con alta potencia. Una comparación más directa reveló una fuerte asociación entre las puntuaciones de *K* de quinasas específicas con los SC contra su inhibidor (Figura 5c). En general, KAR modeló con precisión la viabilidad en las ocho líneas celulares probadas, según lo evaluado por análisis de regresión lineal (valores *r* de Pearson que van desde 0,49 a 0,90 con una media de 0,76, *P* = 0,016), y en general, el modelo mostró una relación estadísticamente significativa entre las dos métricas (*r* = 0,67; *P* = $1,0 \times 10^{-10}$; 4 Figura6). Estos datos muestran que KAR modeló con precisión la contribución de las quinasas a la viabilidad celular en cultivos de líneas celulares *in vitro*.

La clasificación de actividad de quinasas (KAR) modela la contribución de las actividades de quinasa a la viabilidad celular en células de AML primaria.

Para determinar si el enfoque puede ser capaz de identificar quinasas reguladoras en un conjunto independiente de células, se miden los fosfoproteomas de 45 biopsias de AML primarias, enriquecidas con casos de cariotipo normal, un marcador de riesgo intermedio para la enfermedad. KAR del conjunto de datos resultante (Figura 7a) indicó que, al igual que con los experimentos en líneas celulares, las CDK, ERK1, CK2A1 y PAK1 se clasificaron frecuentemente de forma alta en estas células cancerosas primarias (Figura 7b). Sin embargo, a diferencia de las líneas celulares, ATR y PKACA también ocuparon un lugar destacado en varios pacientes.

Para investigar si KAR reflejaba la contribución de sus respectivas quinasas a la viabilidad en muestras de AML primaria, las células se trataron con inhibidores contra P38A, CK2, MEK1 (para inhibir la señalización de ERK), PAK y PKC412 (que inhibe varias quinasas, incluida el receptor tirosina quinasa Flt3, cuyo gen a menudo está alterado en la AML). Se decidió probar estos compuestos porque, si bien la participación de las CDK en la AML está bien documentada, la contribución de ERK1, PAK y CK a la biología de la AML se comprende menos. PKC/Flt3i y P38 α i sirvieron como controles negativos ya que se encontró que las puntuaciones de *K* de sus objetivos de quinasa eran bajas en la mayoría de los casos. Se obtuvieron curvas de dosis-respuesta en 36 muestras de AML primaria (Figura 8) y se calcularon los valores de IC₅₀ y SC (Figura 7c). En promedio, las células de AML primaria fueron más sensibles a CK2i, PAK1i y MEK1i que a PKC/Flt3i y P38 α i (Figura7c), lo que coincide con las puntuaciones de *K* altas para CK2A1, PAK1 y ERK1 en relación con las de PKC/Flt3i y P38 α i objetivos (PKC/tirosina quinasas y P38A, respectivamente).

Al igual que con los datos de la línea celular (Figura 5), las actividades de quinasa predichas reflejaron la sensibilidad de las células a los inhibidores en blastos de AML primarios. En la Figura 7d se muestran ejemplos de datos de dos muestras de pacientes y en la Figura 10 se muestran los datos de los otros pacientes. Los modelos de análisis de regresión lineal mostraron que en 31 de las 36 biopsias, las puntuaciones de *K* y los SC se correlacionaron con *r* > 0,6 (Figura 7e) y con una media global *r* = 0,84. Curiosamente, la puntuación de *K* de MEK1 se asoció con las respuestas al inhibidor de MEK1 (Figura 7f), independientemente del estado de mutación de NRas o Kras (estos se habían vinculado previamente a las respuestas a los inhibidores de MEK en la AML). De manera similar, la puntuación de *K* de JAK2 (tégase en cuenta que JAK2 actúa más adelante de Flt3) se asoció débilmente con la sensibilidad a PKC412 (que inhibe Flt3) en todas las muestras, y esto fue un mejor predictor de la sensibilidad que el estado de mutación de Flt3 (Figura 7g). En general, estos datos indican que los modelos que utilizan puntuaciones de *K* para cuantificar la contribución de las quinasas al resultado de la señalización son capaces de predecir el impacto de inhibir una quinasa determinada en la viabilidad celular en líneas celulares (Figura 5) y células primarias (Figura 7d, e y Figura 10).

Las diferencias en las actividades de las quinasas están asociadas con la complejidad de los fenotipos de respuesta a los fármacos.

En lugar de ser resistentes o sensibles a compuestos individuales, las células de AML primaria mostraron patrones complejos de respuestas (Figura 9a). Por ejemplo, al imponer un umbral de reducción del 50% en la viabilidad con un tratamiento de 1 μ M, 10/36 casos fueron sensibles a al menos tres inhibidores (grupos 1 a 5 en la Figura 9a), mientras que 13/36 casos fueron resistentes a todos los compuestos (grupo 13). Cinco y tres casos fueron sensibles a CKi solamente (grupo 11) o solo a MEK1i (grupo 12), respectivamente. Estos fenotipos no pudieron racionalizarse considerando solo la contribución de la quinasa objetivo. Por lo tanto, se investigaron patrones de actividades de quinasas que pueden explicar la heterogeneidad observada en las respuestas. Si bien las clasificaciones citogenéticas o FAB (francesa-americana-británica) no fueron diferentes entre los grupos de respuesta, hubo marcadas diferencias en las puntuaciones de *K* (Figura 11a). Por ejemplo, las tirosina quinasas y PLK1 aumentaron en las células sensibles (grupos 1-5) en relación con las células resistentes (grupo 13) y hubo una correlación inversa entre las actividades en las células sensibles a MEK1i solo o solo a CK2i (Figura 11b-e). En las células sensibles a MEK1i (grupo 12), las puntuaciones de *K* de RAF aumentaron, mientras que las de ATR disminuyeron en relación con las muestras de pacientes con otros patrones de inhibición (Figura 9b, c). Por lo tanto, las proporciones de las puntuaciones de *K* de RAF con respecto a ATR fueron significativamente mayores en este grupo que en cualquier otro grupo de respuesta (Figura 9d). De manera similar, mientras que la puntuación de *K* de CK2A1 no fue inesperadamente mayor en el grupo 11 (células sensibles solo a CK2i, Figura 9e), la puntuación de *K* de PKCA disminuyó significativamente en este grupo de muestras (Figura 9f) y la relación CK2A1: PKCA fue mayor en las células sensibles a CK2i en relación con los otros

grupos (Figura 9g). Por lo tanto, además de la activación de la quinasa objetivo, la respuesta exclusiva a un compuesto dado requirió la ausencia de activación de las vías de pro-supervivencia que actúan en paralelo con el objetivo.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un inhibidor de una enzima modificadora de proteínas adecuado para tratar a un paciente, que comprende:

5 i) calcular el valor de K para cada enzima modificadora de proteínas en una muestra obtenida de dicho paciente usando un método de cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra, que comprende ingresar datos cuantitativos de la fosfoproteómica de espectrometría de masas (MS) y calcular el valor de K para dicha enzima modificadora de proteínas de la siguiente manera:

10

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j}$$

en la que

15 m = el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;

α = la intensidad de los péptidos modificados i ;

i = cada péptido modificado en la muestra que es un sustrato de dicha enzima modificadora de proteínas;

l = el número total de péptidos modificados en la muestra;

β = la intensidad de los péptidos modificados j ; y

20 j = todos los péptidos modificados en la muestra;

(ii) identificar la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ; y

(iii) seleccionar un inhibidor que se dirija a la enzima modificadora de proteínas con el valor más alto de K ,

25 en el que la enzima modificadora de proteínas es una proteína quinasa y el paciente padece o se sospecha que padece cáncer.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el valor de K se calcula para dicha enzima modificadora de proteínas como sigue:

30

$$K = \frac{\sum_{i=1}^m \alpha_i}{\sum_{j=1}^l \beta_j} \cdot \left(\frac{m}{t}\right)^{1/2}$$

en la que

t = el número total de péptidos modificados objetivo conocidos para dicha enzima modificadora de proteínas.

35

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el cáncer es leucemia o linfoma.

4. El método de acuerdo con cualquiera reivindicación anterior, en el que el cáncer es leucemia mieloide aguda (AML).

40 5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la proteína quinasa se selecciona del grupo que consiste en CDK1, CDK2, ERK1, PAK1, CK2, ATR y PKACA.

6. El método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende además identificar y/o cuantificar péptidos modificados en una primera muestra y una segunda muestra usando espectrometría de masas (MS).

45

7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la identificación y/o cuantificación de péptidos modificados en una primera muestra y una segunda muestra se realiza mediante un método que comprende las siguientes etapas:

(a) obtener péptidos de una muestra;

50 (b) añadir péptidos modificados de referencia a los péptidos obtenidos en la etapa (a) para producir una mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia;

(c) llevar a cabo espectrometría de masas (MS) sobre dicha mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia para obtener datos relacionados con los péptidos en la muestra; y

(d) comparar los datos relacionados con los péptidos de la muestra con los datos de una base de datos de péptidos modificados usando un programa informático;

55

en el que la base de datos de péptidos modificados se recopila mediante un método que comprende:

i) obtener péptidos de una muestra;

60 ii) enriquecer péptidos modificados a partir de los péptidos obtenidos en la etapa i;

iii) realizar cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) sobre los péptidos modificados enriquecidos obtenidos en la etapa ii;

iv) comparar los péptidos modificados detectados en la etapa iii con una base de datos de referencia conocida para identificar los péptidos modificados; y
v) recopilar datos relacionados con los péptidos modificados identificados en la etapa iv en una base de datos.

5 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la etapa (b) comprende además enriquecer péptidos modificados a partir de dicha mezcla de péptidos y péptidos modificados de referencia para producir una mezcla de péptidos modificados enriquecidos y la etapa (c) comprende llevar a cabo espectrometría de masas (MS) sobre dicha mezcla de péptidos modificados enriquecidos para obtener datos relacionados con los péptidos modificados en la muestra, y opcionalmente en el que la etapa de enriquecimiento de péptidos modificados se lleva a cabo mediante cromatografía.

10 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la cromatografía se selecciona del grupo que consiste en cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC), cromatografía de dióxido de titanio (TiO₂) y cromatografía de dióxido de circonio (ZrO₂) y opcionalmente en el que la etapa de enriquecimiento de péptidos modificados se lleva a cabo utilizando métodos basados en anticuerpos.

15 10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que los datos relacionados con los péptidos en la muestra comprenden la relación masa/carga (m/z), carga (z) y tiempo de retención relativo de los péptidos.

20 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que la etapa iv se lleva a cabo utilizando el motor de búsqueda MASCOT, o en el que los datos relacionados con los péptidos modificados identificados en la etapa iv se seleccionan del grupo que consiste en la identidad del péptido modificado, relación masa/carga (m/z), carga (z) y tiempo de retención relativo del péptido modificado.

25 12. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la técnica de MS usa marcadores de isótopos para la cuantificación, opcionalmente en el que la técnica de MS usa marcaje metabólico (por ejemplo, aminoácidos marcados con isótopos estables en cultivo (SILAC)) o derivatización química (por ejemplo, iTRAQ, ICAT, TMT).

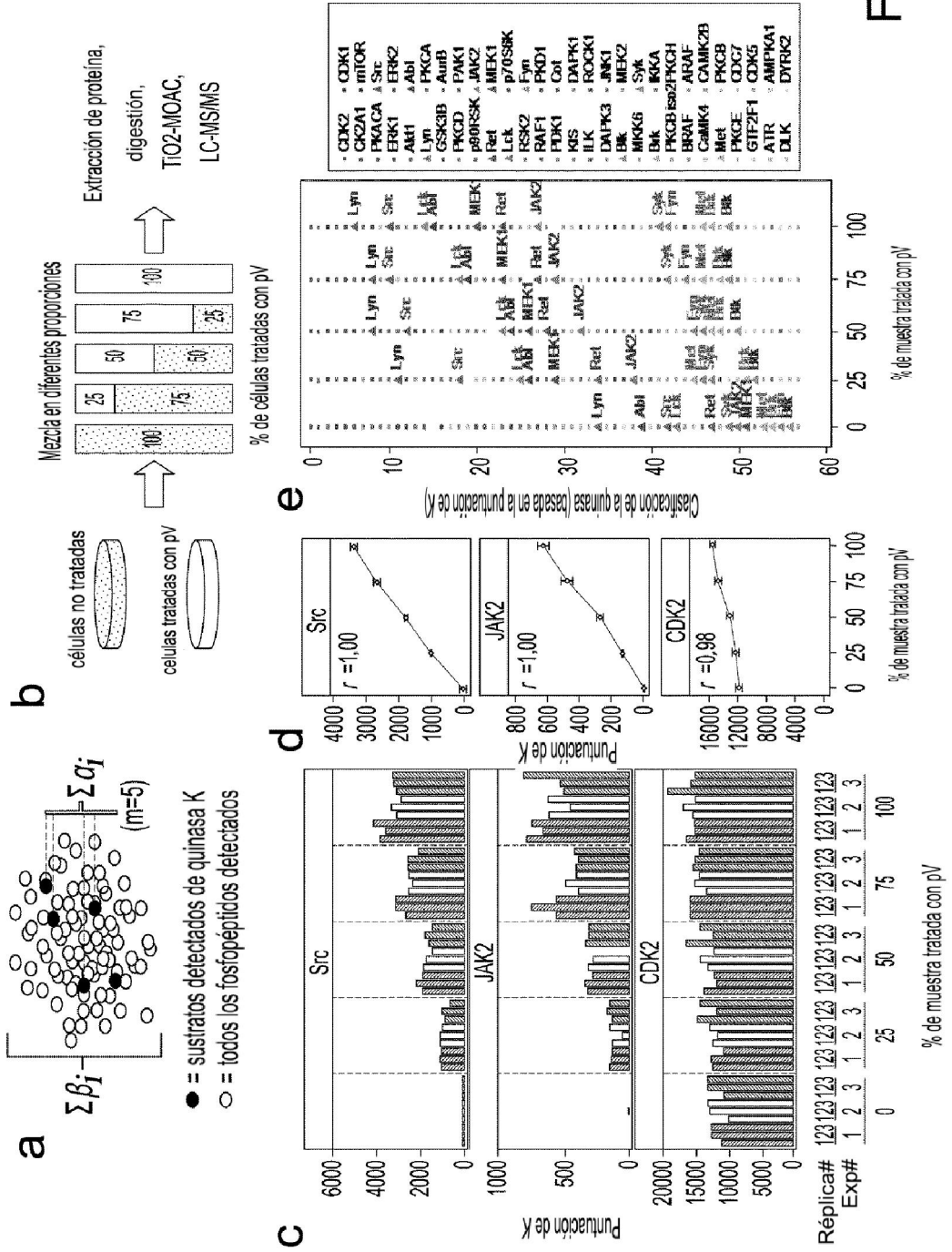
30 13. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la cuantificación de la actividad de una enzima modificadora de proteínas en una muestra comprende:

(i') determinar el número total de péptidos modificados en la muestra;
 (ii') determinar la intensidad de los péptidos modificados;
 35 (iii') determinar el número de péptidos modificados en la muestra que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
 (iv') determinar la intensidad de los péptidos modificados que son sustratos de dicha enzima modificadora de proteínas;
 (v') calcular el valor de *K* para dicha enzima modificadora de proteínas de acuerdo con la reivindicación 1,

40 en el que el valor de *K* es directamente proporcional al nivel de actividad de dicha enzima modificadora de proteínas.

14. Un medio legible por ordenador que comprende un código legible por ordenador operable, en uso, para instruir a un ordenador para que realice el método de cualquier reivindicación anterior.

45 15. Un dispositivo que comprende una memoria que tiene un código ejecutable por ordenador almacenado en ella dispuesto para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y un procesador dispuesto para ejecutar el código almacenado en la memoria.



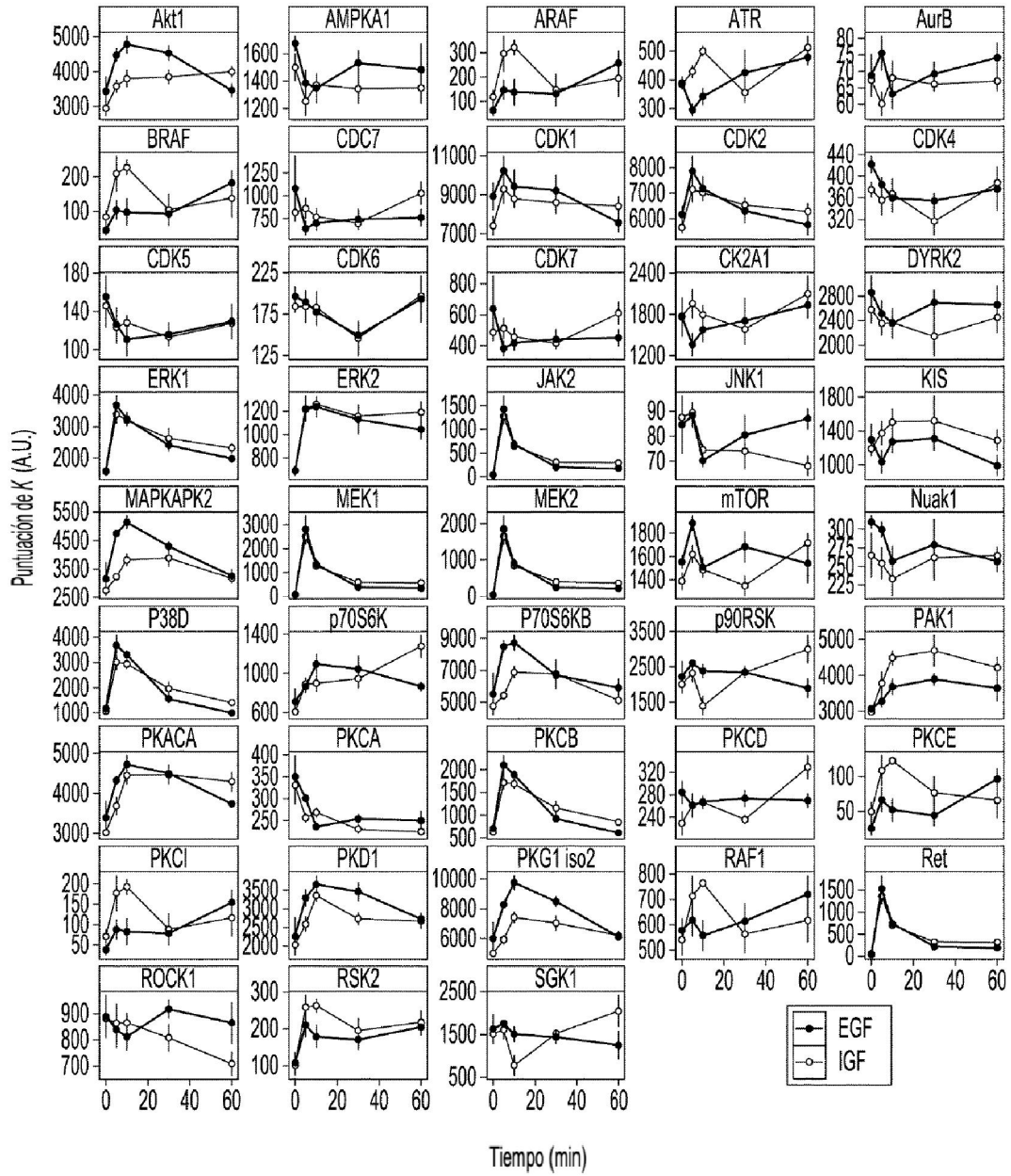


Fig. 2

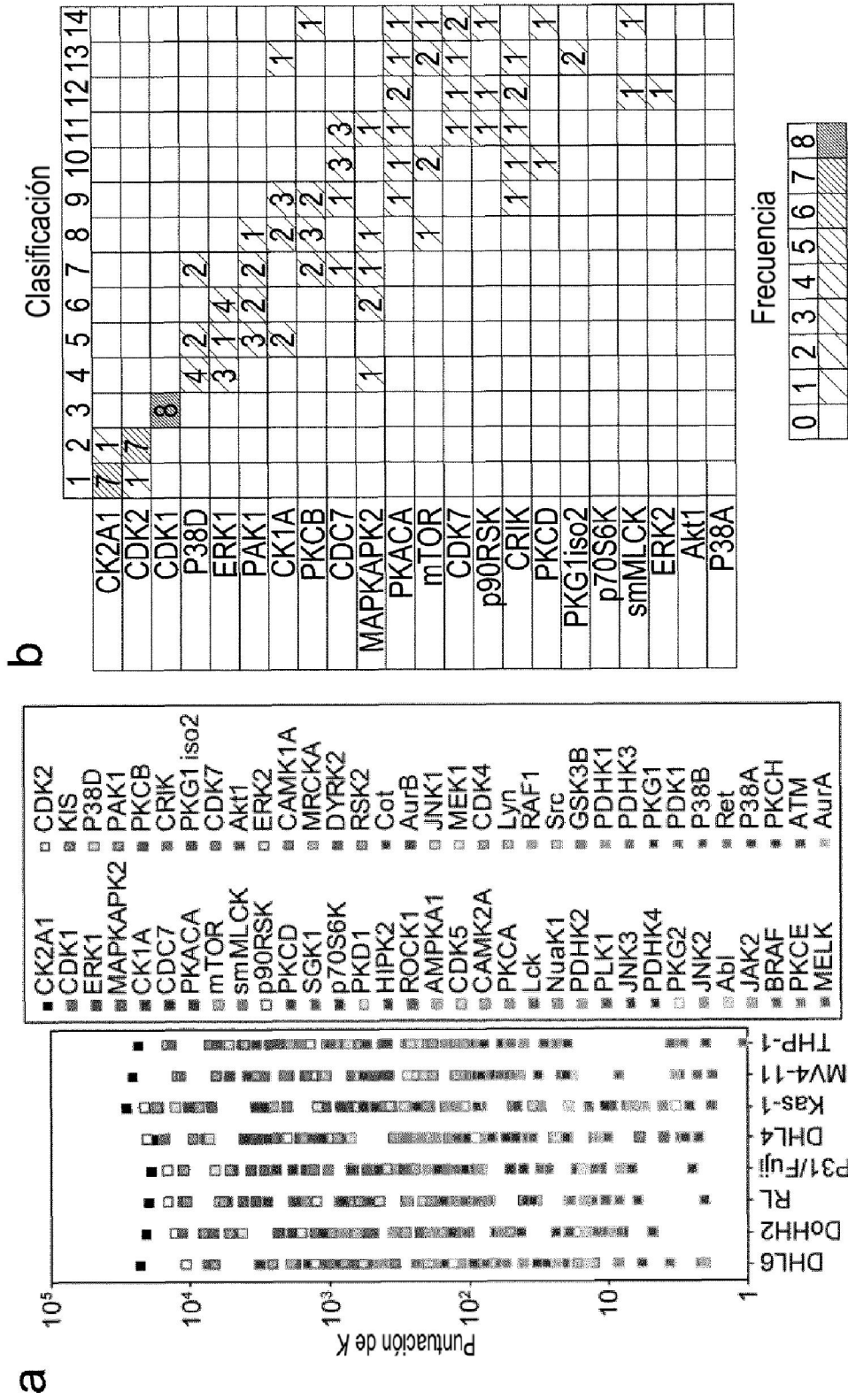


Fig. 3

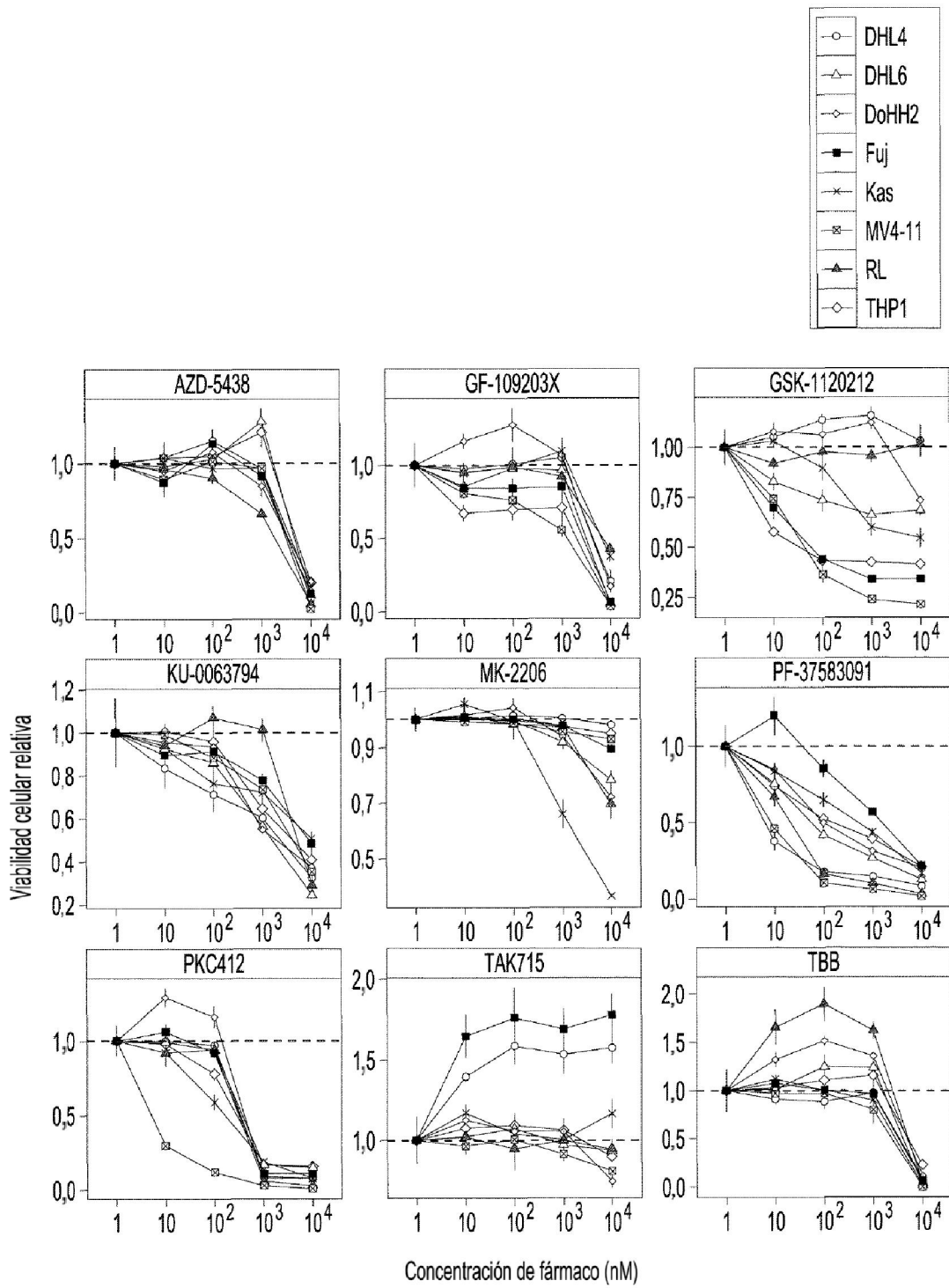


Fig. 4

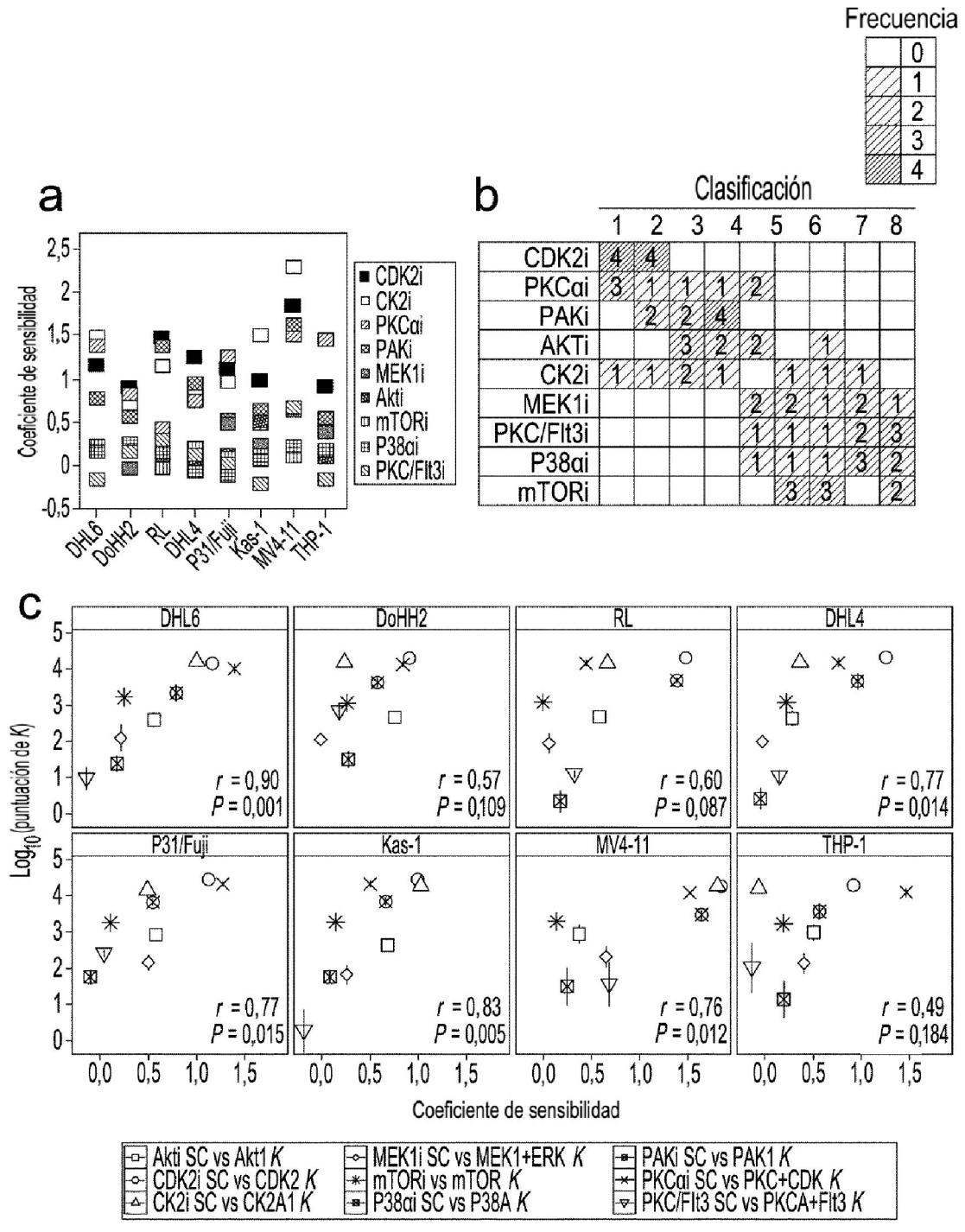


Fig. 5

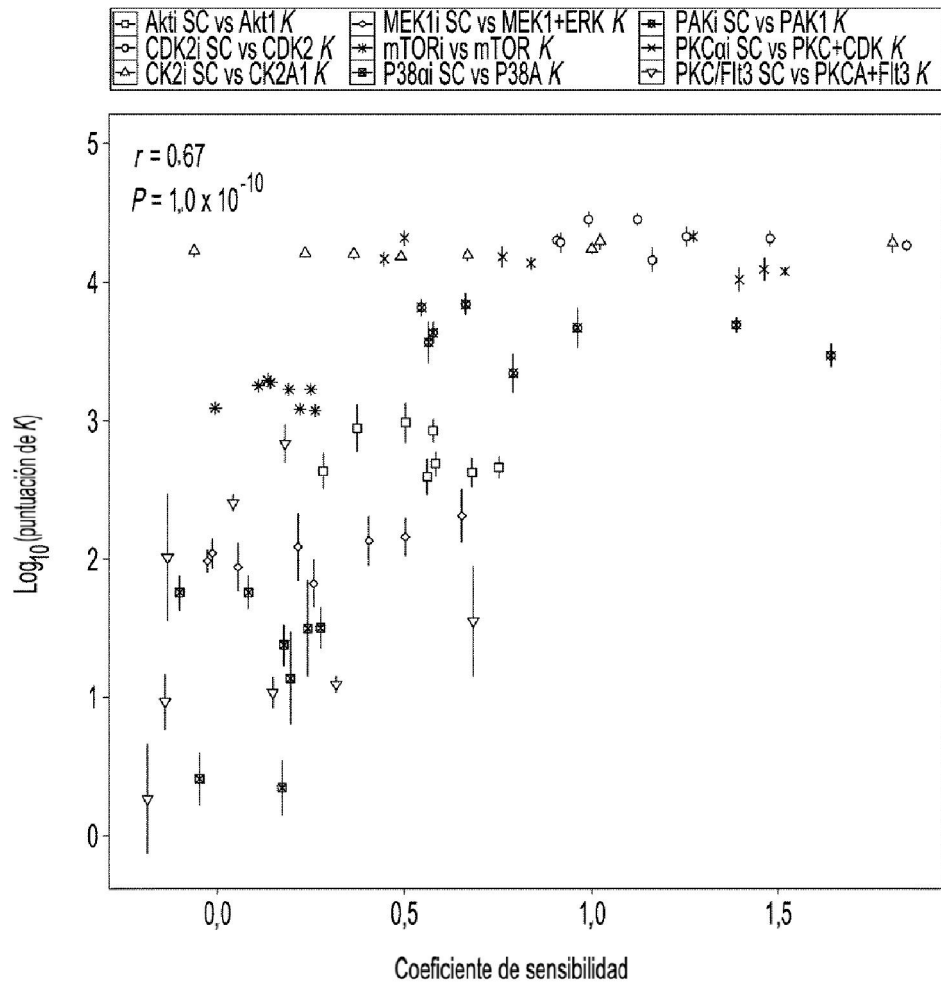


Fig. 6

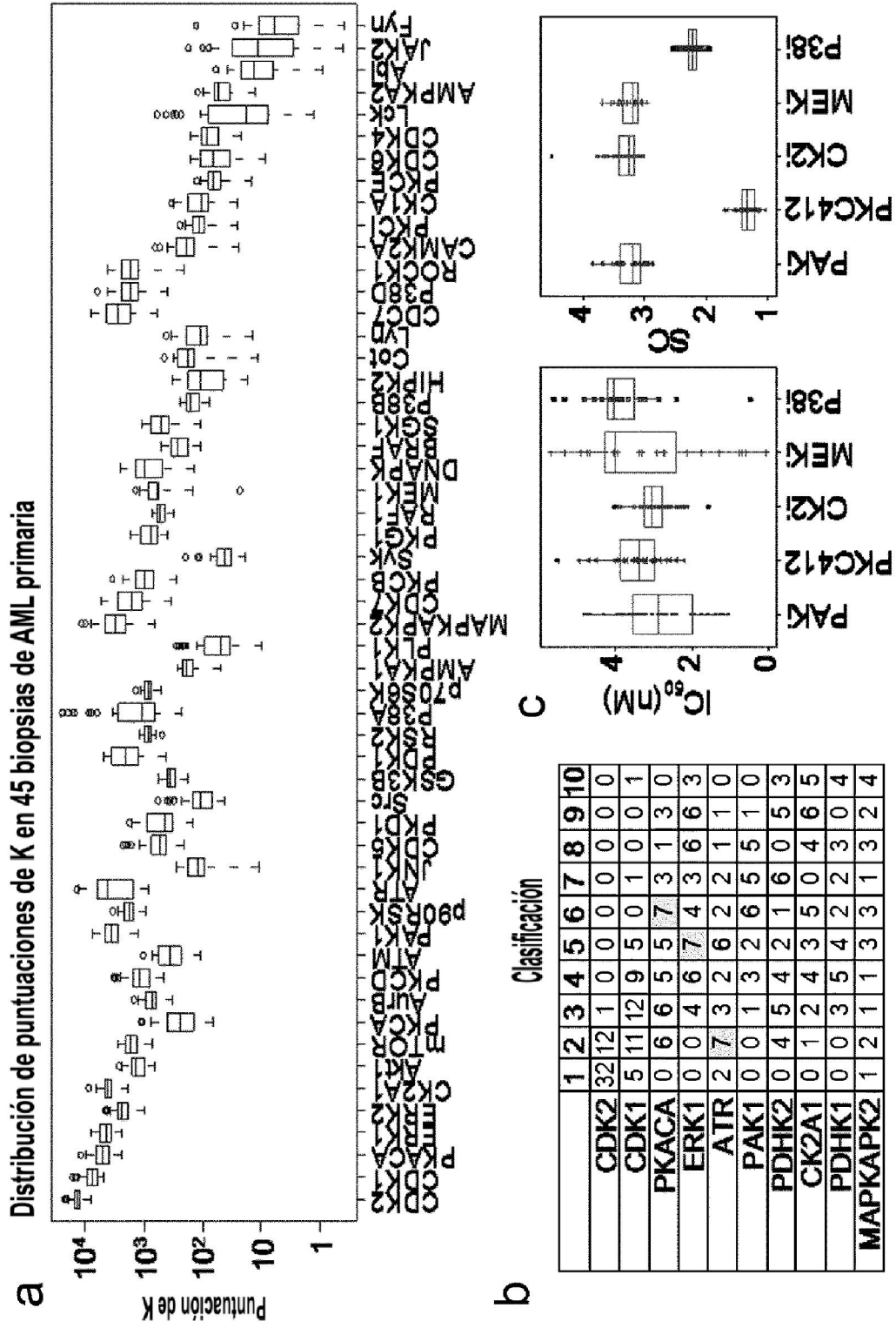


Fig. 7

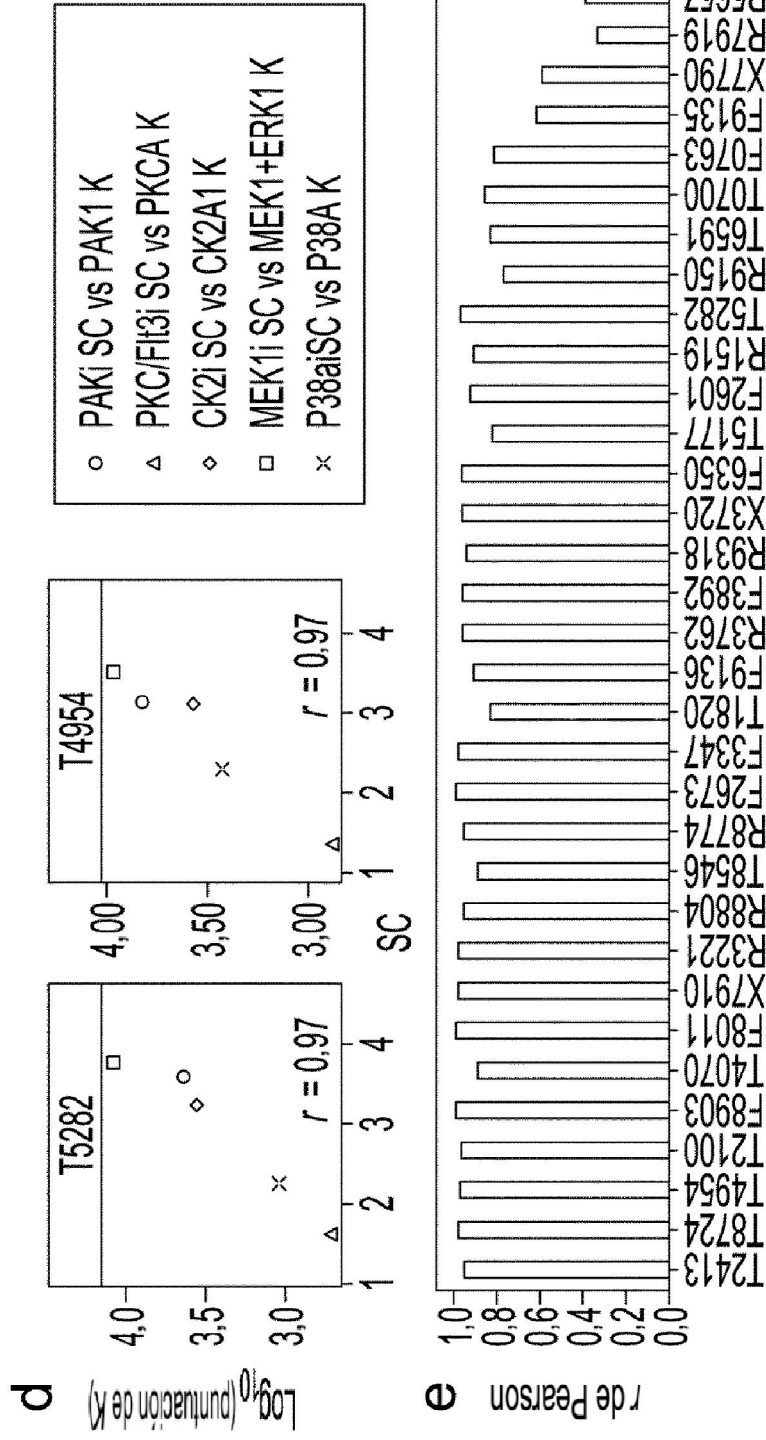


Fig. 7

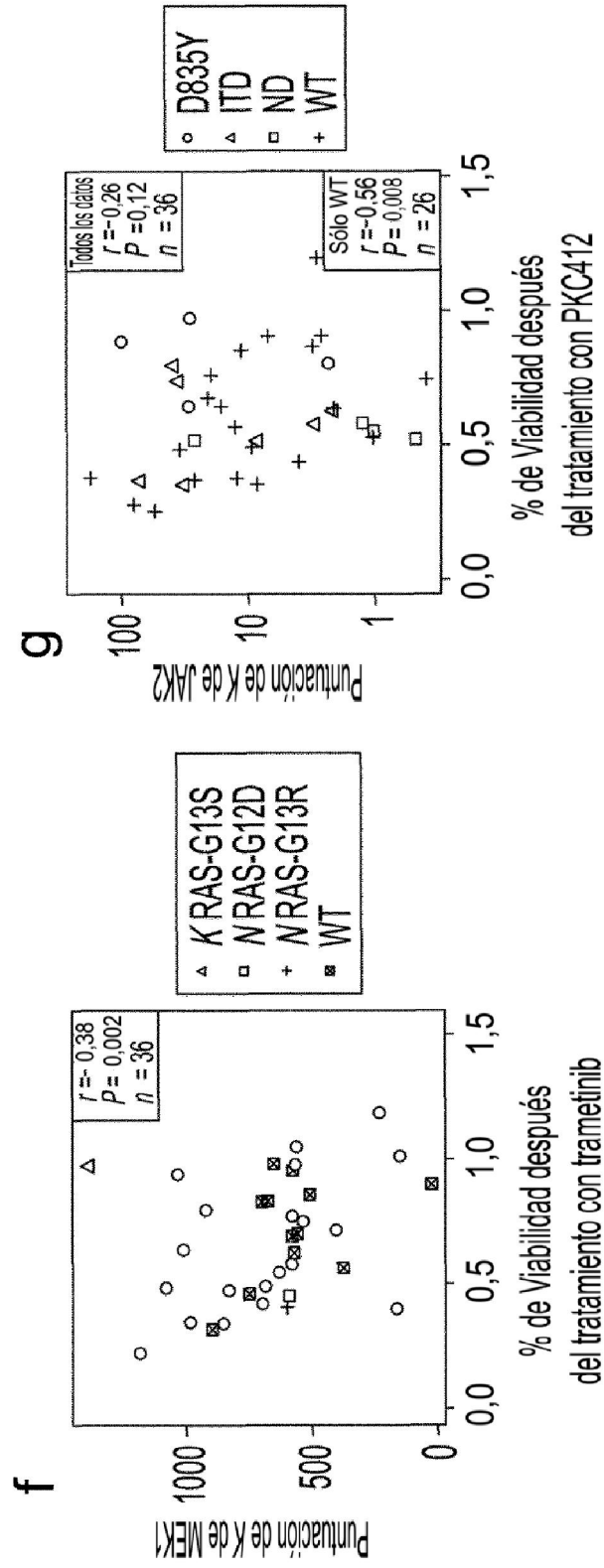


Fig. 7

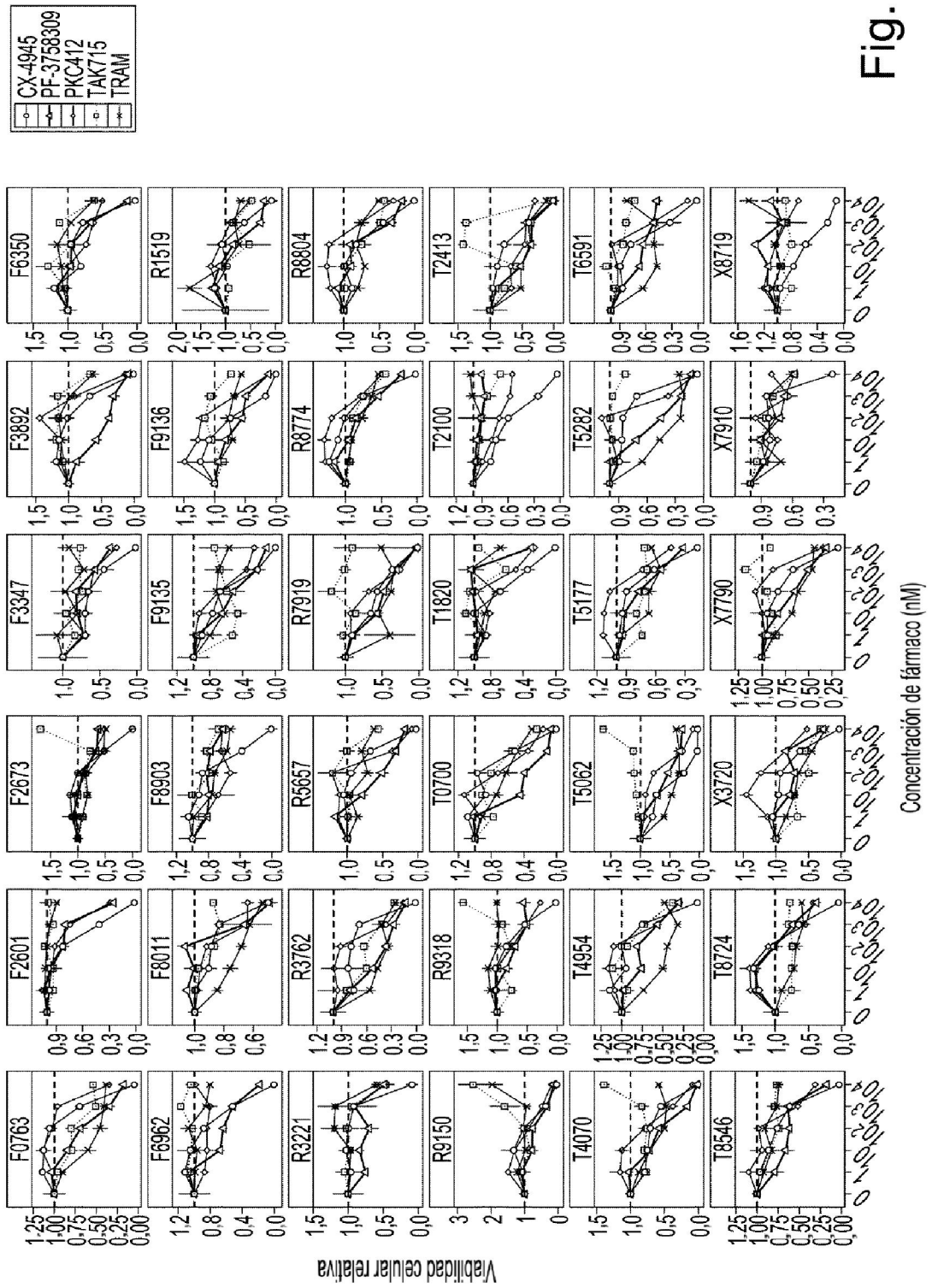


Fig. 8

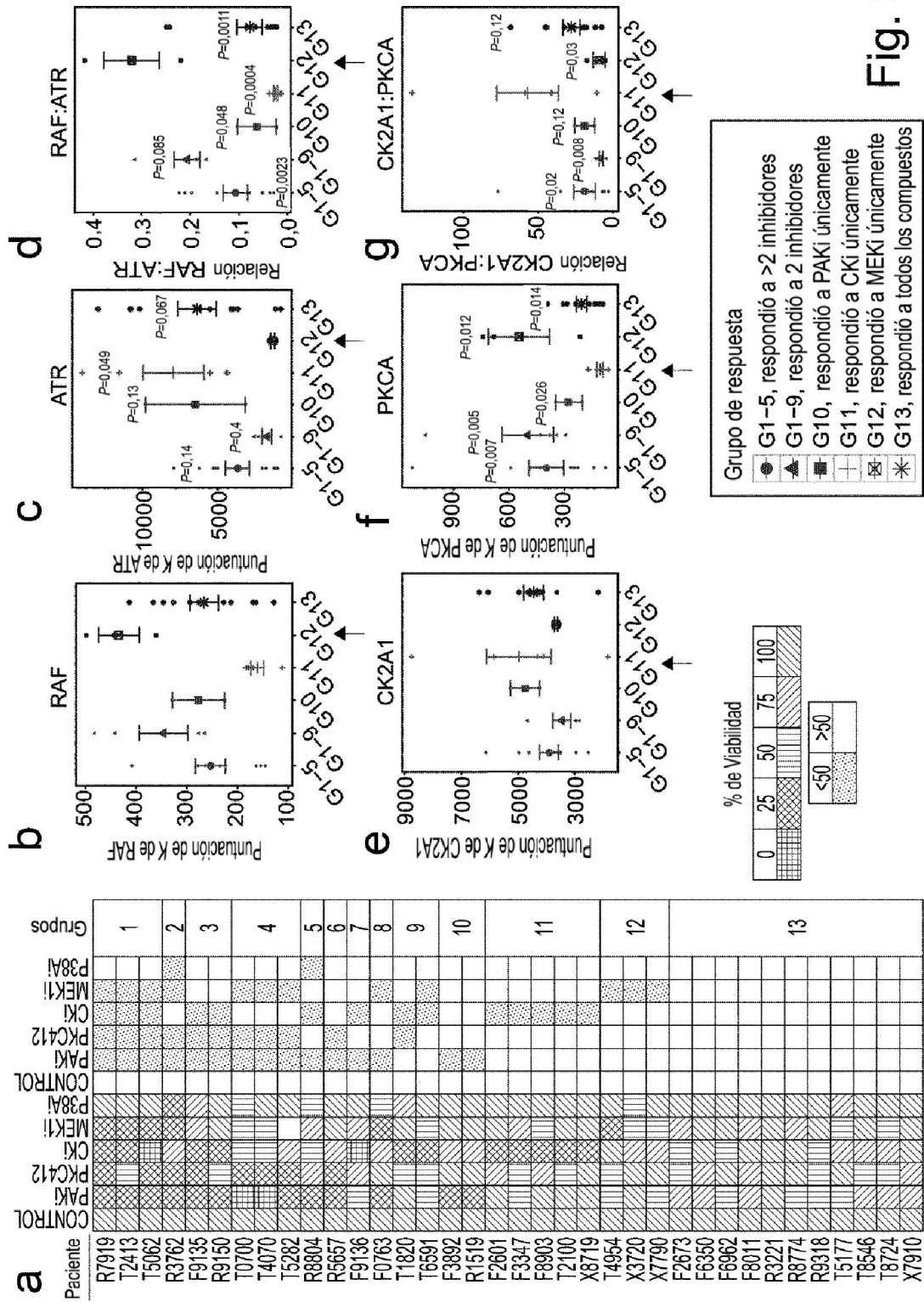


Fig. 9

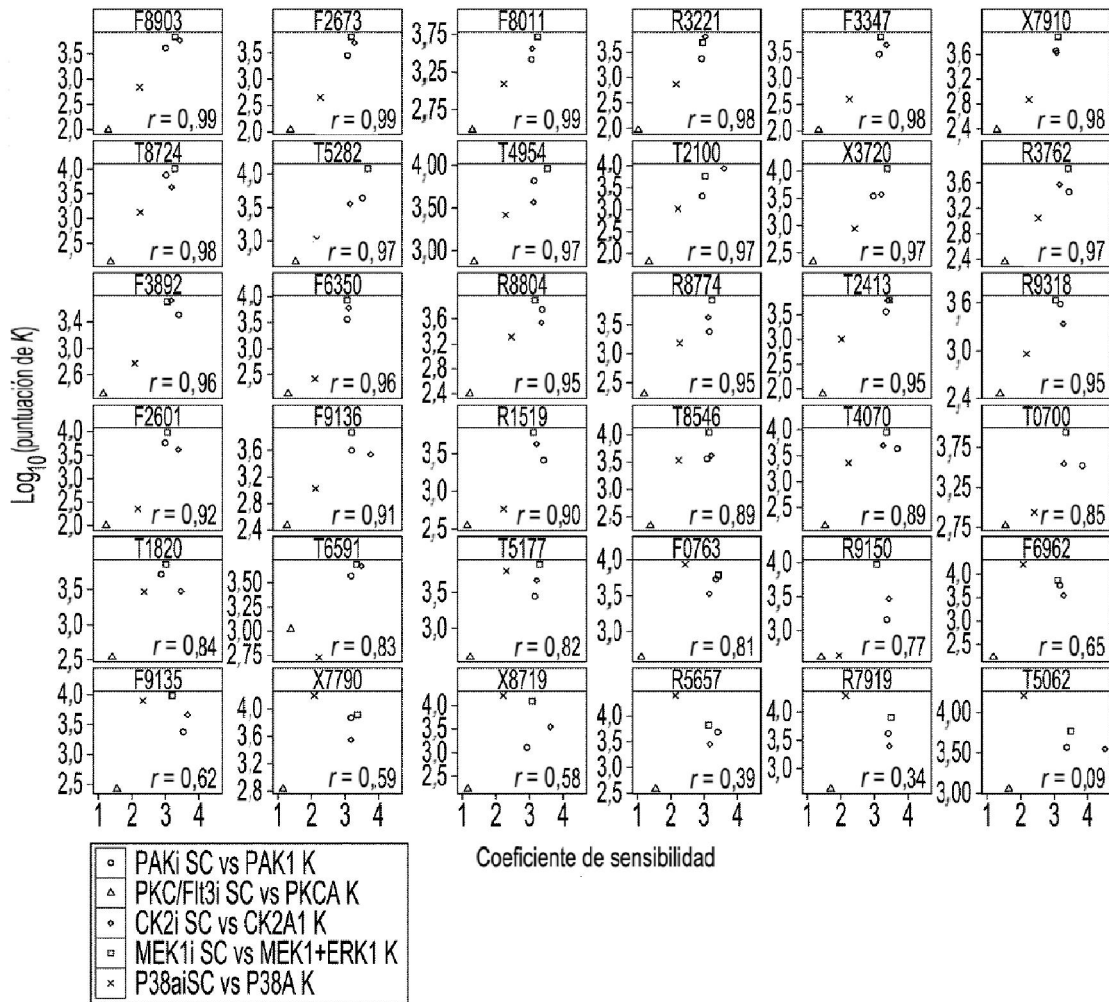


Fig. 10

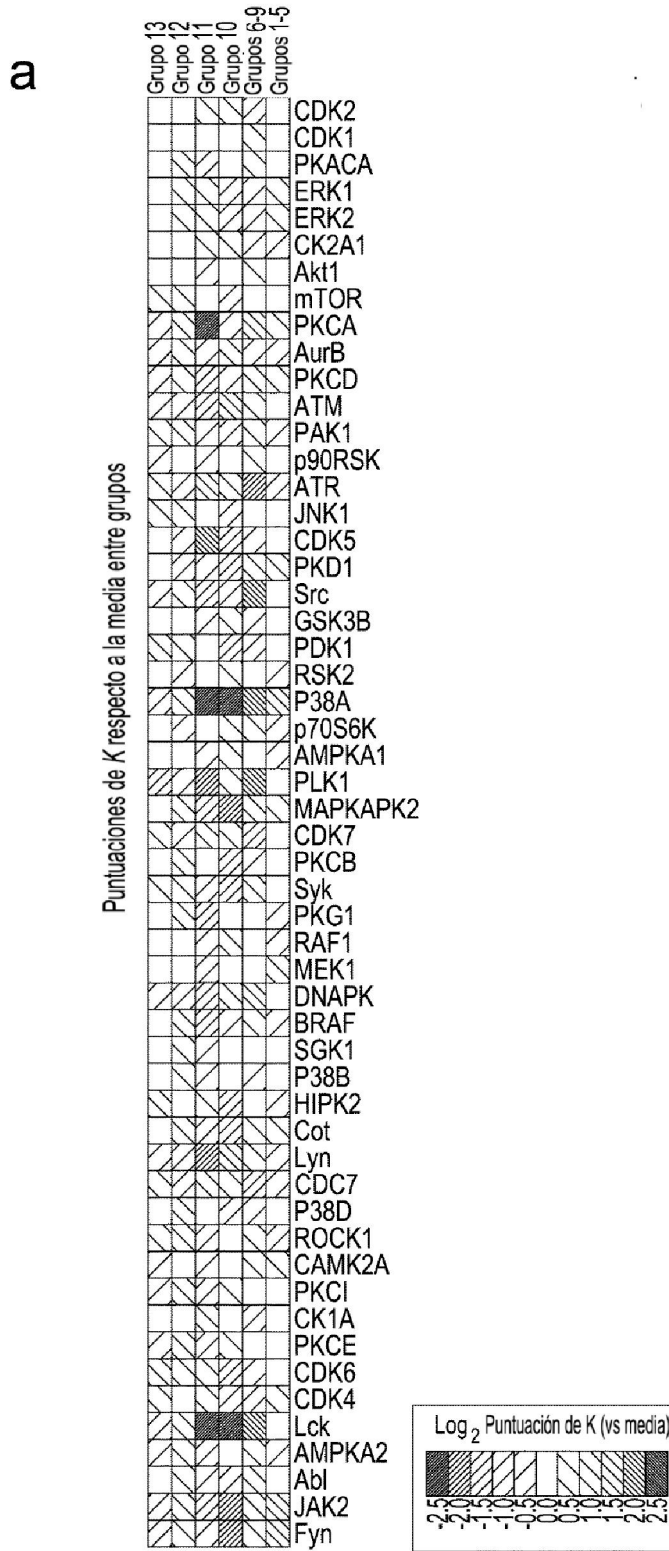


Fig. 11

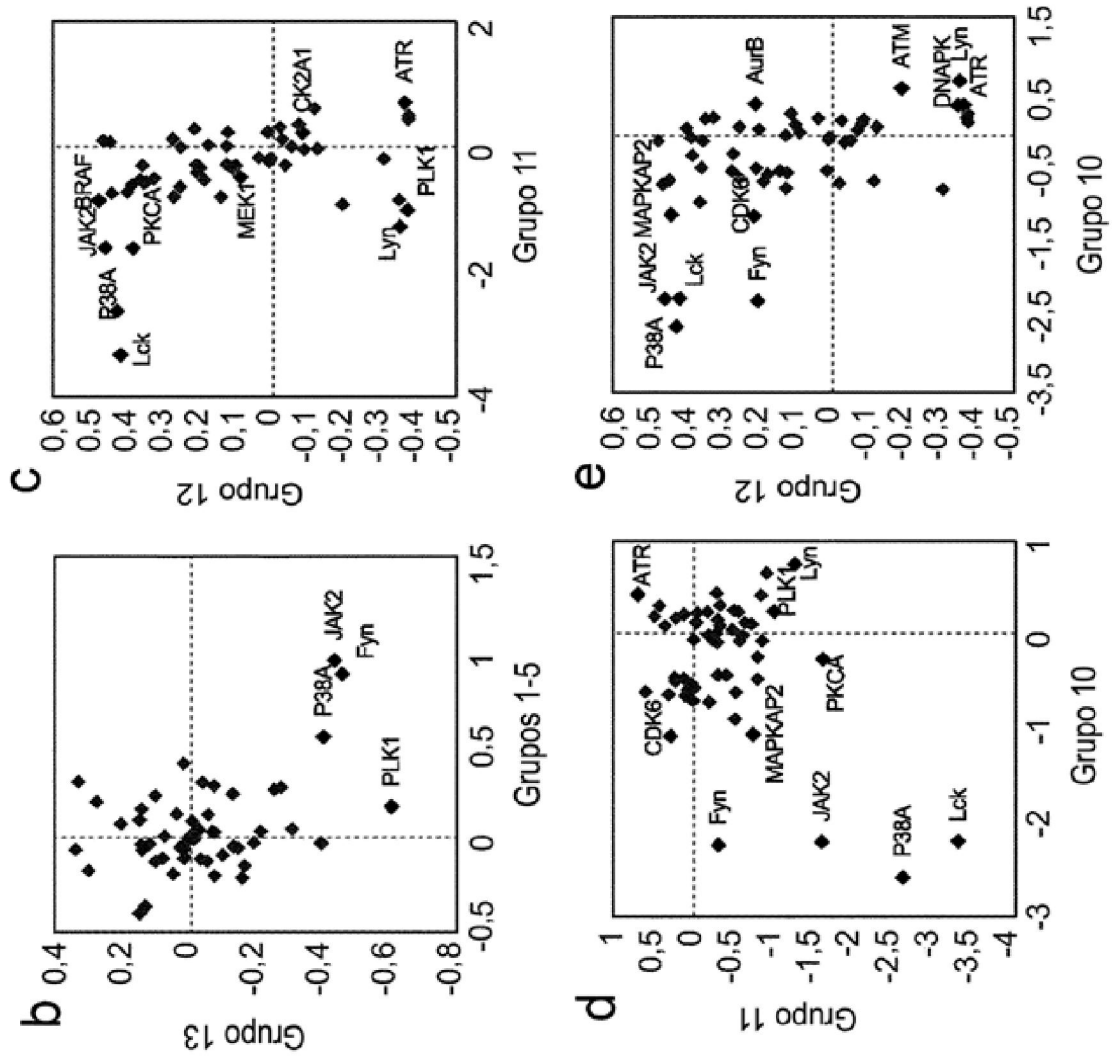


Fig. 11