

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 294**

51 Int. Cl.:

A61K 35/13 (2015.01)

C12N 5/09 (2010.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2016 PCT/US2016/049063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17040311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2016 E 16842698 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022 EP 3340996**

54 Título: **Sistemas y procedimientos para emparejar firmas oncológicas**

30 Prioridad:

28.08.2015 US 201562211562 P

10.11.2015 US 201562253342 P

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

01.06.2022

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
412 Low Memorial Library, 535 West 116th Street
New York, NY 10027, US**

72 Inventor/es:

**CALIFANO, ANDREA y
ALVAREZ, MARIANO, JAVIER**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 913 294 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

Sistemas y procedimientos para emparejar firmas oncológicas

5 ANTECEDENTES

Ciertos esfuerzos en la medicina oncológica de precisión se basan en la identificación de "mutaciones de oncogenes accionables", bajo el supuesto de que su inhibición farmacológica provocará la adicción a oncogenes¹. A pesar de la integración de esta metodología en la atención clínica del cáncer, siguen existiendo retos.

10 En primer lugar, la estratificación de pacientes con cáncer basada en mutaciones accionables² ha demostrado que ciertas neoplasias malignas en adultos carecen por completo de alteraciones accionables o se presentan con mutaciones en oncogenes no susceptibles de tratamiento (por ejemplo, proteínas de la familia 'RAS/MYC) o en genes de valor terapéutico no caracterizado³. Además, si bien el direccionamiento de oncogenes puede lograr respuestas
15 iniciales, estas pueden ir seguidas de una rápida recaída debido a la aparición de resistencia a los fármacos^{4,5}. Además, el análisis de cientos de líneas celulares y compuestos muestra que, con la excepción de un puñado de dianas bien caracterizadas (por ejemplo, *ERBB2*, *EGFR*, *mTOR*, *ALK*, *MET*, *PI3K* y *ESR1*, entre otros), las mutaciones monogénicas pueden ser malos predictores globales de sensibilidad a los inhibidores de la proteína correspondiente⁶.

20 La sensibilidad a fármacos representa un fenotipo poligénico (es decir, complejo) multifactorial, que destaca la necesidad de enfoques novedosos que complementen y amplíen el paradigma de la alteración accionable. Por consiguiente, existe la necesidad de un enfoque novedoso que complemente y amplíe el paradigma de la alteración accionable.

25 El documento US 2011/172929 describe procedimientos para cribar anticuerpos específicos de CD40 que tratan el linfoma de Burkitt. Jung Hoon Woo y col., "Elucidating Compound Mechanism of Action by Network Perturbation Analysis", *Cell*, vol. 162, n.º 2, 1 de julio de 2015, páginas 441-451 describen procedimientos de cribado de compuestos de camptotecina, etopósido y doxorubicina que tratan el cáncer. Mariano J Alvarez y col., "Using viper, a package for Virtual Inference of Protein-activity by Enriched Regulon analysis", 22 de julio de 2013, páginas 1-14, describen un
30 protocolo para realizar VIPER. Muna Affara y col., "Vasohibin-1 identified as a master-regulator of endothelial cell apoptosis using gene network analysis", *BMC Genomics, Biomed Central*, vol. 14, n.º 1, 16 de enero de 2013, página 23, describen el uso del análisis de redes de genes para identificar la vasohibina 1 como un regulador maestro de la apoptosis de las células endoteliales.

35 Karol Baca-López y col., "The Role of Master Regulators in the Metabolic/Transcriptional Coupling in Breast Carcinomas", *Plos One*, vol. 7, n.º 8, 27 de agosto de 2012, página 42678, describen un enfoque de integración de datos que combina evidencia experimental para la expresión génica de todo el genoma de alto rendimiento, un análisis termodinámico sin equilibrio, redes de correlación no lineal, así como minería de bases de datos, para delinear la función que los factores de transcripción MEF2C y MND4 pueden tener como principales reguladores maestros en la
40 fenomenología del cáncer de mama primario.

Federico M. Giorgi y col., "Inferring Protein Modulation from Gene Expression Data Using Conditional Mutual Information", *Plos One*, vol. 9, n.º 10, 14 de octubre de 2014, página 109569, describen el uso del algoritmo Conditional Inference of Network Dynamics, para la inferencia específica del contexto y de todo el genoma de las dependencias
45 reguladoras entre la proteína de señalización y la actividad del factor de transcripción, a partir de datos de expresión génica.

RESUMEN

50 La presente invención se define en las reivindicaciones, que enumeran:

1. Un procedimiento para cribar un compuesto que trata una enfermedad o trastorno, que comprende:

55 medir cuantitativamente la actividad proteica de una pluralidad de proteínas reguladoras maestras en una muestra de dicha enfermedad o trastorno, donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se basa directa o indirectamente en la expresión de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, y donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras comprende inferir computacionalmente la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras a partir de perfiles de expresión génica de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, donde dicha inferencia computacional de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se realiza mediante la técnica VIPER;
60 exponer dicha muestra a dicho compuesto;
medir cuantitativamente la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras en dicha muestra tratada con compuesto, donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se basa directa o indirectamente en la expresión de regulones de dichas

proteínas reguladoras maestras, y donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras comprende inferir computacionalmente la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras a partir de perfiles de expresión génica de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, donde dicha inferencia computacional de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se realiza mediante la técnica VIPER; y evaluar cuantitativamente la inversión de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras en dicha muestra tratada con compuesto en comparación con una muestra de dicha enfermedad o trastorno sin tratamiento con dicho compuesto o un modelo expuesto a un vehículo usado para suministrar dicho compuesto.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde un compuesto que induce la inversión global de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras indica que dicho compuesto trata dicha enfermedad o trastorno.

3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde dicho compuesto se selecciona de entre el grupo que consiste en compuestos químicos de molécula pequeña, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, anticuerpos, aptámeros, modificaciones de los mismos y combinaciones de los mismos.

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha enfermedad o trastorno es un tumor.

5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde dicho tumor se selecciona de entre el grupo que consiste en glioblastoma, meningioma, leucemia, linfoma, sarcoma, carcinoide, neuroendocrino, paraganglioma, melanoma, de próstata, páncreas, vejiga, estómago, colon, mama, cabeza y carcinoma de cuello, riñón, gástrico, del intestino delgado, ovario, hepatocelular, del cuerpo uterino y pulmón.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se basa directa o indirectamente en el enriquecimiento de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dichos perfiles de expresión génica se obtienen a partir de modelos in vivo.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dichos perfiles de expresión génica se obtienen a partir de modelos in vitro.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dichos regulones se infieren mediante ARACNe.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A y 1B representan la densidad de probabilidad para el coeficiente de correlación y la posición de rango relativo para las firmas de ARNm ("101"), matrices de proteínas de fase inversa ("102") y actividad proteica inferida por VIPER ("103").

Las figuras 2A-2C representan mapas de calor para la expresión génica (A y C) y la actividad proteica inferida por VIPER (B). El color rojo indica genes regulados positivamente o proteínas activadas, el color azul indica genes regulados negativamente o proteínas inactivadas, el color gris indica datos faltantes.

La figura 3 representa la validación de los inhibidores de MYC inferidos por VIPER en células MCF7. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figuras 4A y 4B. (A) Enriquecimiento de los MR de punto de control de NET-MET en las firmas de actividad proteica inferida por VIPER con respuesta a fármacos. (B) Efecto de entinostat (inhibidor de HDAC identificado por el enfoque oncoMatch), belinostat (inhibidor de HDAC que no afecta el punto de control de NET-MET) y tivantinib sobre el crecimiento del xenoinjerto H-STS.

Figuras 5A y 5B. (A) Mapa de calor que muestra la puntuación sinérgica (indicada como intensidad de color rojo), inferida como el aumento en el enriquecimiento de cada MoA de la combinación de pares de fármacos en comparación con el MoA de compuestos individuales (indicado como intensidad de color azul en la primera fila y la columna). (B) Curva característica operativa del receptor que muestra la predicción de la interacción sinérgica para todas las combinaciones de los 14 compuestos evaluados. Se indican los 16 pares de compuestos que se encuentran sinérgicos por la actividad de Bliss (conjunto de datos del desafío DREAM de 2012). Se identificaron 8/16 (50 %) pares sinérgicos a una FPR del 10 %.

Figuras 6A-6E. (A) Puntuaciones OncoMatch para 4 líneas celulares que indican hasta qué punto recapitulan el punto de control de NET-MET de la metástasis tumoral individual. (B y C) Enriquecimiento del punto de control de NET-MET para dos pacientes en la firma de la actividad proteica inferida por VIPER de la línea celular H-STS. (D) Mapa de calor que indica la puntuación oncoMatch para 55 líneas celulares (columnas) como modelos para cada una de las 173 muestras de carcinoma de mama basal (filas). Solo las coincidencias con un valor de $p < 10^{-1}$ se muestran en color naranja. (E) Selección de 3 líneas celulares que cubren mejor el espacio tumoral del carcinoma de mama basal (173 tumores). Las barras "601" indican la cobertura específica de la línea celular. Las barras "602" muestran la cobertura acumulada.

Las figuras 7A y 7B representan los subtipos moleculares de EP-NET. (A) Análisis de conglomerados no supervisado de 211 muestras de EP-NET basándose en su perfil de expresión génica. (B) Análisis de conglomerados no supervisado basado en la actividad proteica inferida por VIPER para 5.578 proteínas reguladoras.

Las figuras 8A y 8B representan reguladores maestros para la progresión metastásica. (A) Mapa de calor que muestra la conservación de las 50 proteínas más desreguladas en asociación con la metástasis hepática entre cada par de muestras posible. (B) Mapa de calor que muestra la actividad proteica relativa de las 20 proteínas más

desreguladas de cada uno de los cuatro conglomerados.

Las figuras 9A-9E representan la conservación de los reguladores maestros de metástasis en líneas celulares NET y un modelo de xenoinjerto. (A) Enriquecimiento de las 100 proteínas más desreguladas de cada metástasis en cada línea celular y la firma de la actividad proteica del modelo de xenoinjerto H-STS. (B-E) Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para las 50 proteínas más activadas y las 50 proteínas más desactivadas en cada metástasis seleccionada en la firma de actividad proteica de la línea celular H-STS (B y C) y el modelo de xenoinjerto H-STS (D y E).

Las figuras 10A-10E representan compuestos de molécula pequeña que revierten el punto de control regulador de la metástasis. (A) Enriquecimiento de los MR de punto de control de metástasis del paciente 0 en las firmas de actividad proteica inducidas por 6 compuestos seleccionados en las células H-STS. (B y C) Curvas de crecimiento para el xenoinjerto H-STS mientras se trata con control de vehículo y cada uno de los 6 compuestos seleccionados. (D) Enriquecimiento del punto de control de metástasis del paciente 0 en las firmas de actividad proteica inducidas por 4 compuestos seleccionados en el xenoinjerto H-STS. (E) Enriquecimiento del punto de control del xenoinjerto H-STS en las firmas de actividad proteica inducidas por 4 compuestos seleccionados en el xenoinjerto H-STS.

La figura 11 representa la fiabilidad del interactoma como modelos para EP-NET. Gráfico de violín que muestra la densidad de probabilidad para la puntuación de enriquecimiento normalizada absoluta (INES) y la *puntuación de red* integrada calculada como el área sobre la probabilidad acumulada |NES| (véanse las figuras 13A y 13B). NES se calculó mediante VIPER para 211 muestras de EP-NET y todas las proteínas reguladoras representadas en los 25 interactomas evaluados (véase la Tabla 2)

Las figuras 12A-12C representan el análisis no supervisado de 211 muestras de EP-NET. (A) Gráficos de dispersión que muestran los primeros 5 componentes principales, capturando el 35 % de la varianza para 211 perfiles de expresión de EP-NET. (B) Proyección 2D-tSNE para los datos de expresión. (C) Proyección 2D-tSNE de la actividad proteica inferida por VIPER para 211 muestras de EP-NET.

Las figuras 13A-13G representan la fiabilidad del conglomerado. (A) Gráfico de densidad de probabilidad para la fiabilidad del conglomerado estimada a partir de los perfiles de expresión y los perfiles de actividad proteica inferida por VIPER para 211 muestras de EP-NET (véase la figura 13D). (B) Puntuación de fiabilidad integrada para la estructura de conglomerados completa calculada como el área sobre la curva de probabilidad acumulada. (C) Puntuación de fiabilidad integrada para diferentes estructuras de conglomerados (diferente número de conglomerados) para el conglomerado de consenso de 211 perfiles de la expresión de EP-NET ("1301") o de actividad proteica inferida por VIPER ("1302"). (D) Puntuación de fiabilidad del conglomerado para 211 perfiles de expresión de EP-NET y de actividad proteica inferida por VIPER después del conglomerado de consenso en 4 y 5 conglomerados, respectivamente. (E y F) Fiabilidad del conglomerado (E) y puntuación de silueta (F) para cada muestra de la estructura de 4 conglomerados basada en la expresión y la estructura de 5 conglomerados basada en datos de la actividad proteica inferida por VIPER. (G) Pertenencia a conglomerados para el modelo de xenoinjerto H-STS.

Las figuras 14A y 14B representan los MR de progresión metastásica. (A) Conservación de los 25 MR más activados y los 25 MR más inactivados entre 66 metástasis hepáticas de NET. (B) Número óptimo de conglomerados basándose en los reguladores de progresión metastásica.

La figura 15 representa los resultados del análisis oncoTreat. El mapa de calor muestra el enriquecimiento de los MR conservados de cada tumor y el modelo de xenoinjerto H-STS en la firma de actividad proteica provocada por cada perturbación farmacológica en las células H-STS. La fuerza de enriquecimiento se muestra como $-\log_{10}(\text{valor de } p)$ y se indica mediante números. Solo se incluyeron en este análisis las metástasis que mostraron una similitud significativa, a nivel de MR con el modelo de xenoinjerto H-STS. El gráfico de enriquecimiento de la izquierda muestra el enriquecimiento de los MR del paciente 0 recapitulados por el modelo de xenoinjerto, en cada firma de actividad proteica de perturbación farmacológica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se define en las reivindicaciones. La materia objeto de la presente descripción proporciona procedimientos para emparejar firmas, incluyendo firmas de actividad proteica inferidas a partir del perfil de expresión génica. Las firmas de actividad proteica son inferidas por VIPER. Los procedimientos descritos en esta invención se usan para identificar: (a) muestras biológicas que son similares debido a sus perfiles de actividad proteica, con el caso especial de modelos coincidentes (líneas celulares, organoides, modelos de ratón, etc.) con muestras de tejido obtenidas de pacientes (por ejemplo, un tumor) porque recapitulan la actividad de las proteínas clave que determinan el fenotipo celular del tejido, (b) fármacos y compuestos de molécula pequeña que, como agentes únicos, revierten los reguladores maestros del estado celular y, por lo tanto, desestabilizan específicamente el fenotipo celular anulando así la viabilidad del tumor, y (c) fármacos que muestran un efecto sinérgico (es decir, más que aditivo) al revertir los reguladores maestros del estado celular y, por lo tanto, actúan sinérgicamente para desestabilizar el fenotipo celular y anular la viabilidad del tumor.

Las proteínas clave, que se denominan reguladores maestros (MR, por sus siglas en inglés), son aquellas que tienen la actividad diferencial positiva más alta (activada de forma aberrante) y negativa más alta (inactivada de forma aberrante), en comparación con un tejido de control, en función de un umbral de significación estadística (por ejemplo, un valor de p de aproximadamente 0,01 o menos corregido para pruebas de hipótesis múltiples). Los tejidos de control pueden incluir el tejido normal del que se obtiene un tumor (por ejemplo, epitelio de mama normal para adenocarcinoma de mama), el tumor primario para una muestra metastásica o un tumor sensible a fármacos para uno

que es resistente a fármacos. El conjunto completo de MR para un tumor específico se denomina punto de control tumoral.

5 En el caso del tejido tumoral, se ha demostrado que las proteínas MR constituyen un determinante clave del estado del tumor y, por lo tanto, dependencias específicas del tumor cuya actividad aberrante es necesaria para la viabilidad tumoral. Por lo tanto, los fármacos que actúan como agente único o combinaciones revierten el conjunto específico de MR para un tumor particular (por ejemplo, un punto de control tumoral) representan opciones terapéuticas potencialmente valiosas.

10 Ciertos procedimientos para comparar muestras, tumores y modelos se basan en su similitud en sus niveles de expresión génica o de abundancia de proteínas, o la conservación de alteraciones genéticas. Si bien los dos primeros pueden ser fiables a nivel de población y ser útiles para el descubrimiento de subtipos, pueden ser desproporcionados (es decir, poco reproducibles) a nivel de un solo tumor y de una sola célula (*véanse las figuras 1A, 1B y 2B*). La figura 1A ilustra la densidad de probabilidad para el coeficiente de correlación calculado entre muestras del mismo subtipo de linfocitos B basándose en la expresión ("101") y la actividad proteica inferida por VIPER ("103"). La figura 1B ilustra la densidad de probabilidad para la posición de rango relativo del gen más sobreexpresado (ARNm, "101"), proteína abundante (RPPA, "102") o proteína activada (VIPER, "103") de un tumor de carcinoma de mama basal en el otro tumor de carcinoma de mama basal perfilado por TCGA. Por otra parte, la conservación de alteraciones genéticas puede ser poco reproducible, dado el elevado número de posibles combinaciones de alteraciones genéticas y la escasa correlación entre dichas alteraciones y los subtipos de tumor. Se realizó un análisis de conglomerados no supervisado de células individuales aisladas de un solo tumor de glioblastoma basándose en la expresión génica o la actividad proteica inferida por VIPER, y los resultados se muestran en las figuras 2A (para la expresión génica) y 2B-2C (para la actividad proteica inferida por VIPER). Si bien no se puede detectar una estratificación clara basándose en la expresión génica (*véase la figura 2A*), el análisis que involucró la actividad proteica inferida por VIPER mostró una fuerte separación de las células en dos subpoblaciones, que se definen por la actividad proteica diferencial de reguladores previamente caracterizados de los subtipos proneural y mesenquimatoso (*véase la figura 2B*). La figura 2C muestra la misma disposición de células (columnas) y los genes (filas) que en la figura 2B, lo que indica que las subpoblaciones y los genes asociados no pueden identificarse directamente a partir de los datos del perfil de expresión génica.

30 Un procedimiento descrito a modo de ejemplo que implica firmas de actividad proteica inferidas a partir del perfil de expresión génica (por ejemplo, firmas de actividad proteica inferidas por VIPER) y, en particular, puntos de control tumorales, es sólido en comparación con la expresión génica y la abundancia de proteínas (RPPA) (*véanse las figuras 1A y 1B*). Esto implica dos propiedades clave de la actividad proteica inferida del perfil de expresión génica (por ejemplo, actividad proteica inferida por VIPER): (1) la actividad proteica se infiere integrando la expresión de decenas a cientos de genes (por ejemplo, actividad proteica inferida por VIPER), que constituyen un ensayo indicador multiplexado endógeno para la actividad de la proteína evaluada (su regulón), mientras que la expresión de ARN y RPPA se basan en la medición desproporcionada de una sola especie; y (2) solo se pueden capturar patrones de expresión génica producidos por programas de regulación transcripcional (por ejemplo, mediante VIPER) y, por lo tanto, los patrones producidos por artefactos técnicos, incluidos los efectos por lotes, se eliminan de manera eficiente (por ejemplo, mediante VIPER).

45 Los procedimientos descritos a modo de ejemplo (por ejemplo, las metodologías OncoMatch y OncoTreat analizadas a continuación) implican la conservación de los puntos de control tumorales (por ejemplo, en las proteínas que controlan el estado de las células tumorales) y, por lo tanto, emparejan los tumores, los modelos y la respuesta farmacológica basándose en el estado y el efecto de las proteínas reales que regulan el fenotipo de las células tumorales.

50 Como se usa en esta invención, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular según lo determinado por un experto en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o se determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar dentro de 3 o más de 3 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. Como alternativa, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta el 20 %, preferentemente hasta el 10 %, más preferentemente hasta el 5 %, y aún más preferentemente hasta el 1 % de un valor dado. Como alternativa, particularmente con respecto a los sistemas o procedimientos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud de un valor, preferentemente comprendido en 5 veces y más preferentemente, comprendido en 2 veces.

1. *Proteínas reguladoras maestras y puntos de control tumorales*

60 Según la materia objeto de la presente descripción, las proteínas reguladoras maestras (MR) incluyen proteínas cuya actividad está desregulada estadísticamente de manera significativa (incluyendo proteínas tanto activadas como inactivadas), cuyas dianas transcripcionales (regulón) se expresan diferencialmente en una enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor), en un umbral de significación estadística específico (por ejemplo, un valor de p de aproximadamente 0,01 o menos).

65 Como se usa en esta invención, la expresión "punto de control tumoral" se refiere a un módulo regulador central que

comprende una pluralidad de proteínas MR (por ejemplo, proteínas MR cuya actividad coordinada es necesaria para mantener la viabilidad tumoral) para un tumor específico. La actividad aberrante coordinada de las proteínas MR en un punto de control tumoral es necesaria para mantener el estado de las células tumorales y, por lo tanto, para garantizar la viabilidad tumoral.

5 Las razones para llamar a estos módulos puntos de control de tumores se debe a que, al igual que un punto de control de carretera, canalizan e integran el tráfico de señalización que se origina en una amplia y diversa gama de mutaciones y señales aberrantes cadena arriba.

10 La inhibición genética y/o farmacológica de las proteínas MR puede conducir al colapso del punto de control tumoral y a la pérdida de viabilidad tumoral tanto *in vitro* como *in vivo*, por ejemplo, como se muestra en el linfoma^{7,8}, el glioblastoma⁹, el cáncer de próstata^{10,11} y de mama¹². La extensión adicional de este concepto a la resistencia a los fármacos ha llevado a la identificación de proteínas MR cuya inhibición farmacológica rescata la sensibilidad a los fármacos, incluso en la leucemia¹³ y el cáncer de mama¹². Stat3, CEBP-beta y CEBP-delta se identificaron como el punto de control tumoral para el cáncer de próstata; Notch-1, RUNX1, TLX1 y TLX3 se identificaron como el punto de control tumoral para la leucemia; Myc, BCL6 y BCL2 se identificaron como el punto de control tumoral para el linfoma; AKT1 se identificó como el punto de control tumoral para la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (T-ALL) resistente a la terapia con glucocorticoides; y MYCN y TEAD4 se identificaron como el punto de control tumoral para el neuroblastoma.

20 Los MR en los puntos de control tumorales rara vez mutan o incluso se expresan diferencialmente^{9,11}; más bien implementan módulos fuertemente autorregulados que integran el efecto de un amplio y diverso repertorio de alteraciones genéticas y epigenéticas en las vías cadena arriba^{7,14}.

25 Las proteínas MR provocan esencialidad tumoral⁷ y letalidad sintética^{8-10,12}, lo que representa dependencias clásicas no oncogénicas^{15,16} y puede sugerir una clase novedosa de dianas farmacológicas. Las proteínas MR se pueden priorizar de manera eficiente y sistemática al interrogar las redes reguladoras de todo el genoma con firmas de expresión génica relacionadas con el tumor que representan un subtipo de tumor completo o muestras de tumores individuales usando el algoritmo de inferencia de reguladores maestros (MARINA)^{9,17} y su inferencia virtual equivalente de muestra única de la actividad proteica por análisis de regulón enriquecido (VIPER)¹⁸. La evaluación funcional y bioquímica de las proteínas MR inferidas por MARINA/VIPER ha arrojado tasas de validación en el intervalo del 70 % al 80 %^{8-10,12}.

35 2. Procedimientos para perfilar una enfermedad o un trastorno

El procedimiento de la presente descripción cuantifica el grado de conservación, a nivel de la actividad proteica, entre un tejido, cultivo celular o muestra de una sola célula, o una perturbación específica, y un estado celular de interés, caracterizado por sus proteínas reguladoras maestras (MR) del estado celular, o el punto de control tumoral en el caso de un tumor. El análisis se realiza infiriendo las proteínas MR del estado celular para el fenotipo de interés y a continuación calculando el enriquecimiento de dichos reguladores maestros en la firma de actividad de la proteína reguladora completa del segundo tejido o célula, o se obtiene en respuesta a perturbaciones químicas. El enriquecimiento se calcula mediante el algoritmo analítico de análisis de enriquecimiento de rango, parte de VIPER.

45 En la presente invención, el procedimiento para perfilar una enfermedad o un trastorno (por ejemplo, un tumor) incluye medir cuantitativamente la actividad proteica de una pluralidad de proteínas MR en una muestra de la enfermedad o trastorno; y perfilar la enfermedad o trastorno a partir de la actividad proteica cuantitativa de las proteínas MR.

50 El procedimiento da como resultado la determinación de un perfil de firma de regulador maestro (MR) para una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un tumor. Como se usa en esta invención, un "perfil de firma de regulador maestro (MR) para una enfermedad o trastorno" se refiere a un perfil de actividad proteica de reguladores maestros (MR) que es característico de la enfermedad o trastorno. Dicho perfil de firma de MR es el resultado de una determinación cuantitativa de la actividad proteica de una pluralidad de proteínas MR en una muestra de la enfermedad o trastorno en comparación con la actividad proteica de dichas proteínas MR en un control o referencia adecuados (por ejemplo, individuos sanos, diferentes tipos de la enfermedad o trastorno, o diferentes estadios de la enfermedad o trastorno), identificando así qué combinación de proteínas MR permite la diferenciación de la enfermedad, tipo o estadio de la enfermedad o trastorno sobre el control o referencia.

60 El perfil de firma obtenido del procedimiento de la presente descripción permite el diagnóstico de una enfermedad general o afección de la enfermedad (por ejemplo, un tumor), la distinción entre diferentes tipos (subtipos) de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor), la distinción entre diferentes estadios (por ejemplo, progresión metastásica) de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor), el diagnóstico predictivo de evolución adicional de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor) y la identificación del grado de respuesta a una terapia específica. Los procedimientos de elaboración de perfiles se pueden usar para identificar un tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, un tumor maligno, un tumor benigno, un tumor primario, un tumor secundario, un tumor agresivo y un tumor no agresivo.

El perfil de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor) evalúa o identifica el estado de desregulación de las proteínas MR. El estado de desregulación de las proteínas MR incluye proteínas MR activadas de forma aberrante y proteínas MR inactivadas de forma aberrante.

- 5 La capacidad para identificar proteínas MR depende de la disponibilidad de modelos precisos de regulación específica de tejido, que representan tanto dianas directas de factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) como dianas menos indirectas de proteínas de señalización (SP, por sus siglas en inglés). Los TF y las SP se pueden inferir de manera eficaz mediante el análisis de grandes conjuntos de datos de perfiles de expresión génica específicos de tumor usando el algoritmo para la reconstrucción precisa de redes celulares (ARACNe)^{19,20}, respaldado por extensos
10 ensayos de validación experimental^{9,10,17,21}. El análisis ARACNe del perfil de expresión génica específico de tumor puede producir una red reguladora específica de tumor (interactoma), que se puede usar tanto para evaluar la actividad proteica sobre una base de muestra individual, para un análisis de conglomerados óptimo, como para dilucidar MR novedosos.
- 15 La actividad proteica de las proteínas MR se basa directa o indirectamente en la expresión de regulones de las proteínas MR. Además, la actividad proteica puede basarse directa o indirectamente en el enriquecimiento de los regulones de las proteínas MR. Como se usa en esta invención, el término "regulón" se refiere a las dianas transcripcionales de una proteína, por ejemplo, una proteína MR. El regulón de una proteína específica (por ejemplo, una proteína MR) puede expresarse diferencialmente en un tejido específico, en comparación con un tejido de control
20 (por ejemplo, el promedio de todas las muestras relacionadas con tumores, muestras normales o muestras no tratadas). Se puede inferir un regulón de una proteína específica (por ejemplo, una proteína MR) mediante el algoritmo para la reconstrucción de redes celulares precisas (ARACNe).

25 La medición cuantitativa de la actividad proteica de las proteínas MR incluye la inferencia computacional de la actividad proteica de las proteínas MR a partir de los perfiles de expresión génica de los regulones de las proteínas MR. Los perfiles de expresión génica pueden obtenerse a partir de modelos *in vivo*. Adicionalmente, o como alternativa, los perfiles de expresión génica pueden obtenerse a partir de modelos *in vitro*. La inferencia computacional de la actividad proteica de las proteínas MR se realiza mediante técnicas VIPER.

30 VIPER permite la inferencia computacional de la actividad proteica, sobre una base de muestra individual, a partir de los datos del perfil de expresión génica. VIPER infiere la actividad proteica mediante el análisis sistemático de la expresión del regulón de la proteína¹⁸. VIPER usa la expresión de genes que están más directamente regulados por una proteína dada, tales como las dianas de un TF, como un indicador preciso de su actividad. El análisis de las dianas de TF inferidas por ARACNe^{19,20}, usando MARINA¹⁷, puede ser eficaz para identificar impulsores de fenotipos
35 celulares específicos, que pueden validarse experimentalmente^{9,17}. Si bien VIPER aprovecha el mismo principio que MARINA, implementa un algoritmo dedicado especialmente formulado para estimar la actividad del regulón, que tiene en cuenta el modo de acción del regulador, la confianza en la interacción del gen entre el regulador y la diana y la naturaleza pleiotrópica de la regulación de cada gen diana. Además, VIPER puede extenderse eficazmente a las proteínas de transducción de señales. La técnica VIPER se describe en Alvarez y col., Nat. Genet. (2016);48(8):
40 838:847, la Solicitud Provisional de Patente de EE.UU. N.º 62/211.373 y la Solicitud de Patente de EE.UU. N.º 15/248.975, titulada "Virtual Inference Of Protein Activity By Regulon Enrichment Analysis" presentada a la vez junto con la presente.

45 La actividad proteica, inferida de las lecturas del transcriptoma de una sola muestra usando VIPER, puede ser un descriptor más sólido del estado celular que la expresión génica¹⁸. La razón es triple. En primer lugar, la actividad proteica inferida por VIPER representa un determinante más directo y mecánico del estado celular, en comparación con la expresión génica; en segundo lugar, mientras que las mediciones de la expresión génica individuales son bastante desproporcionadas (es decir, poco reproducibles) y poco reproducibles, VIPER infiere la actividad proteica a
50 partir de la expresión de un gran número (de decenas a cientos) de sus dianas transcripcionales (por ejemplo, el *regulón* de la proteína), lo que da como resultado mucha mayor precisión y reproducibilidad¹⁸; en tercer lugar, el sesgo y el ruido técnico que es inconsistente con el modelo regulador se filtran de manera eficaz, eliminando así una fuente importante de datos confusos. VIPER puede segregar de manera eficaz muestras según el tejido de origen.

55 El análisis VIPER de firmas de expresión génica que representan respuestas celulares a perturbaciones compuestas *in vitro* o *in vivo* puede identificar MR que representan dianas de compuestos físicos (por ejemplo, enzimas para las que el compuesto representa un sustrato de alta afinidad) y efectores (por ejemplo, proteínas no unidas directamente por el fármaco pero necesarias para que este realice su actividad farmacológica), también conocido como el mecanismo de acción (MoA, por sus siglas en inglés) del compuesto. VIPER puede superar el análisis de expresión génica en la elucidación del MoA del compuesto. Esto puede deberse a que las moléculas pequeñas generalmente actúan después de la traducción para afectar a la actividad (en lugar de la expresión) de sus dianas/efectores, lo que
60 afecta a la expresión de sus dianas transcripcionales. De hecho, este análisis se puede usar para identificar agentes que se dirijan de manera eficaz a la actividad de las proteínas MR (véase la figura 3). La figura 3 muestra los resultados de la actividad del ensayo indicador basado en el promotor de TERT-Luciferasa en respuesta a 4 diluciones en serie partiendo de la mitad de cada C120 del compuesto a las 24 h, para garantizar el funcionamiento en un régimen subletal.
65 Siete de los 10 compuestos principales predichos por VIPER para inhibir la actividad de la proteína MYC mostraron una inhibición dependiente de la dosis de su actividad en el ensayo indicador basado en el promotor de TERT.

En determinadas realizaciones de la presente invención, la enfermedad o trastorno es un tumor o un subtipo de tumor. Como se usa en esta invención, la expresión "subtipo de tumor" se refiere a una recopilación de tumores con características moleculares similares. Los ejemplos no limitativos de muestras incluyen extractos de tejidos, células,
 5 tejidos, órganos, sangre, suero sanguíneo, fluidos corporales y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de tumores incluyen glioblastoma, meningioma, leucemia, linfoma, sarcoma, carcinoide, neuroendocrino, paraganglioma, melanoma, de próstata, páncreas, vejiga, estómago, colon, mama, cabeza y carcinoma de cuello, riñón, gástrico, del intestino delgado, ovario, hepatocelular, del cuerpo uterino y pulmón. Otras enfermedades o
 10 trastornos incluyen, pero sin limitación, trastornos neurogenerativos (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer, etc.), diabetes, obesidad y otras enfermedades metabólicas.

3. Procedimientos para identificar compuestos que tratan una enfermedad o un trastorno

15 Cuando se anula la actividad de un MR o MR esenciales (por ejemplo, un par de MR), todo el patrón de actividad de los MR puede colapsar. Esto se debe a que los MR generalmente funcionan como módulos reguladores ajustados (es decir, altamente interconectados), que actúan como interruptores reguladores para mantener el estado celular, normal o relacionado con el tumor. Como resultado, un compuesto que inhibe un MR o MR esenciales puede cribarse o identificarse midiendo el cambio de actividad proteica global de los MR tumorales inferidos por VIPER, después del
 20 tratamiento en células representativas (véase la figura 4A). Los compuestos con mayor efecto en la inversión de la actividad del repertorio completo del punto de control tumoral, pueden hacerlo dirigiéndose a uno o más MR esenciales o pares de MR y, por lo tanto, pueden anular la tumorigénesis *in vivo*.

El procedimiento de la presente descripción se refiere a la priorización de compuestos (por ejemplo, moléculas pequeñas) como inhibidores de MR para inducir el colapso y la regresión *in vivo* del punto de control tumoral mediado
 25 por fármacos, incluso sobre una base de paciente individual. Las proteínas MR candidatas se han validado individualmente para identificar MR esenciales^{7,12} o pares de MR letales sintéticos⁸⁻¹⁰. Este procedimiento puede ser lento, costoso e ineficiente para priorizar el tratamiento del paciente en un contexto de medicina oncológica de precisión. Sin embargo, dado que la inhibición de los MR esenciales o pares de MR puede inducir el colapso del punto de control tumoral global (es decir, la inversión global de la actividad de todos los MR en el módulo), existe una fuerte
 30 razón para usar la actividad del punto de control tumoral específico del paciente (es decir, la firma de toda la firma de proteínas MR) como un ensayo indicador de genes para identificar compuestos capaces de inducir el colapso del punto de control tumoral y la consiguiente pérdida de viabilidad del tumor *in vivo*, sin requerir una validación de MR extensa y duradera.

35 La materia objeto de la presente descripción proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que trata una enfermedad o un trastorno (por ejemplo, inhibe el crecimiento de células tumorales). En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno es un tumor o un subtipo de tumor. El procedimiento de la presente invención incluye: medir cuantitativamente la actividad proteica de una pluralidad de proteínas MR en una muestra de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor); exponer la muestra al compuesto; medir cuantitativamente la actividad
 40 proteica de la pluralidad de proteínas MR en la muestra tratada con compuesto; y evaluar cuantitativamente la inversión de la actividad proteica de la pluralidad de proteínas MR en la muestra tratada con compuesto en comparación con una muestra de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor) sin tratamiento con el compuesto o un modelo expuesto a un vehículo que se usa para suministrar el compuesto, por ejemplo, DMSO. Un compuesto que induce la inversión global de la actividad proteica de la pluralidad de proteínas MR indica que el compuesto trata la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor).
 45

La inversión global de la actividad proteica de una pluralidad de proteínas MR después del tratamiento con uno o más compuestos puede evaluarse basándose en la significación estadística del enriquecimiento de proteínas MR que se inactivan después del tratamiento con compuesto en proteínas MR que se activan de forma aberrante en el tumor y/o el enriquecimiento de proteínas MR que se activan después del tratamiento con compuesto en proteínas MR que se inactivan de forma aberrante en el tumor. La técnica aREA se puede utilizar para medir la significación estadística del enriquecimiento de proteínas. La significación estadística del enriquecimiento de proteínas se puede medir mediante cualquier análisis de enriquecimiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes o metodologías relacionadas en un umbral de valor de p predefinido (por ejemplo, un valor de p
 50 de aproximadamente 0,01 o menos, por ejemplo, 1×10^{-5} , corregido para pruebas de hipótesis múltiples).

Los ejemplos no limitativos de compuestos incluyen compuestos químicos de molécula pequeña, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, anticuerpos, aptámeros, modificaciones de los mismos y combinaciones de los mismos.

60 Mediante la utilización de un procedimiento de cribado de la presente descripción, se identificó entinostat como el agente más potente para revertir el punto de control tumoral de la metástasis del tumor neuroendocrino rectal (NET-MET) (véase la figura 4A). La información del MoA del fármaco se infirió usando una línea celular obtenida de metástasis hepáticas de NET (H-STS), que recapituló el punto de control tumoral inferido de las muestras del paciente (figura 6A). Cuando se ensayó en modelos de xenoinjerto, entinostat anuló por completo el crecimiento tumoral (figura
 65 4B).

5. Procedimientos para evaluar los efectos terapéuticos in vivo de compuestos para tratamientos

El procedimiento de la presente descripción se puede usar para evaluar el grado en que el efecto predicho de un compuesto *in vitro* se recapitula *in vivo* en modelos preclínicos antes de su aplicación terapéutica en pacientes con enfermedades o trastornos (por ejemplo, tumores). Esto se puede realizar mediante el cálculo del enriquecimiento de los MR del punto de control tumoral en la firma de actividad proteica inducida por uno o más compuestos obtenida por análisis VIPER de datos de perfiles de expresión obtenidos de modelos *in vivo*.

La materia objeto de la presente descripción proporciona procedimientos para evaluar el efecto terapéutico *in vivo* de un compuesto para tratar una enfermedad o un trastorno. En determinadas realizaciones, la enfermedad o trastorno es un tumor. Dicho procedimiento incluye medir cuantitativamente la actividad proteica de una pluralidad de proteínas MR en una muestra de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor); exponer la muestra al compuesto; medir cuantitativamente la actividad proteica de la pluralidad de proteínas MR en la muestra tratada con compuesto; y evaluar cuantitativamente la inversión de la actividad proteica de la pluralidad de proteínas reguladoras maestras en la muestra tratada con compuesto en comparación con una muestra de la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor) sin tratamiento con el compuesto o un modelo expuesto a un vehículo usado para suministrar el compuesto (por ejemplo, DMSO). Un compuesto que induce la inversión global de la actividad proteica de la pluralidad de proteínas MR indica que el compuesto probablemente será eficaz para tratar la enfermedad o trastorno (por ejemplo, un tumor) *in vivo* (véanse las figuras 10D y 10E).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de la materia objeto de la presente descripción y no deben considerarse como una limitación de ninguna manera.

Ejemplo 1 - Validación de los inhibidores de Myc predichos por VIPER

VIPER predijo que 17-AAG, alantoína, amoxapina, clortalidona, clemastina, dilazep, etopósido, fulvestrant, furazolidona e ionomicina eran inhibidores de Myc. Se realizó un ensayo indicador basado en el promotor de TERT-luciferasa en estos compuestos para evaluar su actividad inhibidora de Myc. Como se muestra en la figura 3, siete de estos 10 compuestos principales predichos por VIPER para inhibir la actividad de la proteína Myc mostraron una inhibición dependiente de la dosis de su actividad en el ensayo indicador basado en el promotor de TERT.

Ejemplo representativo 2 - Identificación de compuestos que revierten sinérgicamente los puntos de control tumorales

Se generaron perfiles de expresión génica siguiendo la perturbación de células OCI-LY3 DLBCL con 14 compuestos distintos en tres puntos temporales (6 h, 12 h y 24 h) y 2 concentraciones (CI20 a las 24 h y 1/10 de la misma), por triplicado. Estos datos se usaron para predecir la sinergia del compuesto. Se generó un segundo conjunto de datos de ensayos de viabilidad celular CellTiterGlo a las 60 h, después del tratamiento con cada uno de los 91 pares de compuestos únicos, usando una matriz de dilución 4x4 que comienza en cada CI50 del compuesto, para evaluar el enfoque descrito y 31 envíos adicionales al desafío de sensibilidad farmacológica DREAM/NCI. La sinergia se evaluó experimentalmente usando el segundo conjunto para calcular el exceso sobre Bliss (EOB, por sus siglas en inglés); es decir, si el efecto combinado de dos compuestos es significativamente mayor o menor que la suma de sus efectos individuales (independencia de Bliss). La significación estadística se evaluó comparando la diferencia en la media de evaluación múltiple en comparación con la desviación estándar de estas mediciones. Por lo tanto, los pares de compuestos se clasificaron desde los más sinérgicos hasta los más antagonistas usando el EOB. El enfoque descrito no se desarrolló para predecir el antagonismo y, por lo tanto, se evaluó solo en sinergia. En este contexto, superó a todos los otros 31 procedimientos, esencialmente duplicando la sensibilidad de la siguiente mejor técnica. De hecho, del 10 % de las predicciones más significativas, ~60 % se validaron experimentalmente como sinérgicas (véanse las figuras 5A y 5B).

Ejemplo 3 - Identificación de entinostat como el agente más potente para revertir el punto de control tumoral de la metástasis del tumor neuroendocrino rectal (NET-MET)

Se obtuvieron firmas de actividad proteica inferida por VIPER inducida por fármacos para unos pocos fármacos, incluyendo entinostat. Como se muestra en la figura 4A, entre todos los fármacos ensayados, entinostat fue el agente más potente para revertir el punto de control tumoral de la metástasis del tumor neuroendocrino rectal (NET-MET). La información del MoA del fármaco se infirió usando una línea celular obtenida de metástasis hepáticas de NET (H-STs), que recapituló el punto de control tumoral inferido de las muestras del paciente, como se muestra en la figura 6A. Cuando se ensayó en modelos de xenoinjerto (modelos de xenoinjerto H-STs), el entinostat anuló completamente el crecimiento tumoral, mientras que belinostat (un inhibidor de HDAC que no afecta al punto de control de NET-MET) no anuló el crecimiento tumoral, como se muestra en la figura 4B.

Ejemplo 4 - Selección de líneas celulares que recapitulan el punto de control tumoral

Al emparejar directamente la actividad proteica desregulada para los MR que constituyen el punto de control tumoral, se seleccionó H-STS como la línea celular NET que recapitula el punto de control tumoral de NET-MET rectal (véanse las figuras 6A y 6B, y un conjunto de 3 células las líneas se priorizaron como líneas celulares de carcinoma de mama que recapitulaban el punto de control para el 95 % de los tumores de carcinoma de mama basal TCGA (véanse las figuras 6D y 6E).

Ejemplo 5 - Direccionamiento farmacológico sistemático de proteínas reguladoras maestras en tumores neuroendocrinos: Una estrategia novedosa para aplicaciones de medicina oncológica de precisión10 *Resumen*

Este ejemplo está dirigido a un novedosos enfoque de medicina oncológica de precisión ("OncoTreat"; también denominado "OncoMatch") que usa la identificación sistemática y la inhibición farmacológica de proteínas reguladoras maestras (MR), cuya actividad aberrante concertada representa una dependencia crítica de las células cancerosas. Los compuestos en investigación y aprobados por la FDA se priorizaron basándose en su capacidad para anular la actividad de MR en función del análisis de ensayos de perturbación a gran escala. OncoTreat se aplicó a una cohorte de 211 tumores neuroendocrinos enteropancreáticos (EP-NET) con origen en tumores primarios de páncreas (PAN-NET), intestino delgado (SI-NET) y colorrectal (RE-NET). Los perfiles de RNASeq se usaron por primera vez para ensamblar un modelo regulador específico de EP-NET, cuyo interrogatorio identificó las proteínas MR necesarias para el mantenimiento del estado del tumor metastásico. El análisis de los perfiles de RNASeq que representan la perturbación de las células EP-NET con 108 compuestos los priorizó en función de su capacidad para anular los patrones de actividad de MR de pacientes individuales. La validación *in vivo* confirmó que el compuesto que inducía la inversión de la actividad de MR de punto de control más profunda provocó una respuesta drástica *in vivo*, lo que sugiere que el enfoque puede ampliar y complementar los enfoques de medicina oncológica de precisión basados en la adicción a oncogenes.

Introducción

Los esfuerzos emergentes en la medicina oncológica de precisión se basan casi invariablemente en la identificación de "mutaciones de oncogenes accionables", bajo el supuesto de que su inhibición farmacológica provocará la *adicción a oncogenes*¹. A pesar de los notables éxitos iniciales, que han llevado a una rápida integración de esta metodología en la atención clínica del cáncer, están surgiendo importantes desafíos. En primer lugar, la estratificación de pacientes con cáncer basada en mutaciones accionables² ha demostrado que la mayoría de las neoplasias malignas en adultos carecen por completo de alteraciones accionables o se presentan con mutaciones en oncogenes no susceptibles de tratamiento (por ejemplo, proteínas de la familia *RAS/MYC*) o en genes de valor terapéutico no caracterizado³. Además, si bien el direccionamiento de oncogenes puede lograr respuestas iniciales que a veces son notables, estas van seguidas con frecuencia de una rápida recaída debido a la aparición de resistencia a los fármacos^{4,5}. Finalmente, el análisis de cientos de líneas celulares y compuestos muestra que, con la excepción de un puñado de dianas bien caracterizadas (por ejemplo, *ERBB2*, *EGFR*, *mTOR*, *ALK*, *MET*, *PI3K* y *ESR1*, entre otros), las mutaciones monogénicas son malos predictores globales de sensibilidad a los inhibidores de la proteína correspondiente⁶. Esto no es del todo sorprendente, ya que la sensibilidad a los fármacos representa claramente un fenotipo poligénico (es decir, complejo) multifactorial, lo que destaca aún más la necesidad urgente de enfoques novedosos que complementen y amplíen el paradigma de la alteración accionable.

OncoTreat u OncoMatch exploraron estrategias sistemáticas para la priorización de compuestos de molécula pequeña como inhibidores de MR para inducir el colapso y la regresión *in vivo* del punto de control tumoral mediado por fármacos, incluso sobre una base de paciente individual. Las proteínas MR candidatas se han validado individualmente para identificar MR esenciales^{7,12} o pares de MR letales sintéticos⁸⁻¹¹. Este procedimiento puede ser lento, costoso e ineficiente para priorizar el tratamiento del paciente en un contexto de medicina oncológica de precisión. Sin embargo, dado que se ha demostrado que la inhibición de los MR esenciales o pares de MR induce el colapso del punto de control tumoral global (es decir, la inversión global de la actividad de todos los MR en el módulo), existe una fuerte razón para usar la actividad del punto de control tumoral específico del paciente (es decir, la firma de toda la firma de proteínas MR) como un ensayo indicador de genes para identificar compuestos capaces de inducir el colapso del punto de control tumoral y la consiguiente pérdida de viabilidad del tumor *in vivo*, sin requerir una validación de MR extensa y duradera.

OncoTreat u OncoMatch se ensayó en una clase rara de tumores neuroendocrinos enteropancreáticos (EP-NET), que representan NET del páncreas, del intestino delgado y rectales. Una vez que experimentan una progresión metastásica, estos tumores son esencialmente incurables y tienen un mal pronóstico. Usando una cohorte de 211 muestras de pacientes con EP-NET frescas congeladas recogidas en 17 instituciones, las proteínas MR responsables de la progresión metastásica se pueden priorizar en función de un tumor individual y a continuación priorizar un conjunto de 108 compuestos con sensibilidad diferencial de las células EP-NET, en función de su capacidad de invertir globalmente el patrón de actividad de estos MR en lugar de sobre la base de ensayos de viabilidad. La validación en xenoinjertos tumorales seleccionados para emparejar específicamente el perfil de actividad de MR de pacientes individuales confirmó la utilidad del programa OncoTreat u OncoMatch y respalda que el programa OncoTreat u OncoMatch puede proporcionar un complemento valioso para las estrategias basadas en la genética en la medicina oncológica de

precisión.

Procedimientos

- 5 **Evaluación de la eficacia del agente:** Todos los agentes de prueba se formularon según las especificaciones del fabricante. A partir del día 0, las dimensiones del tumor se midieron dos veces por semana con un calibrador digital y se registraron los datos para cada grupo, incluyendo los volúmenes tumorales estimados individuales y medios (TV medio ± SEM). El volumen tumoral se calculó usando la fórmula: $TV = anchura^2 \times longitud \times \pi/2$.
- 10 **Inhibición del crecimiento tumoral y RECIST:** Al finalizar el estudio, se calcularon los valores porcentuales de inhibición del crecimiento tumoral (% de TGI) y se informaron para cada grupo de tratamiento (T) frente al control (C) usando mediciones tumorales iniciales (i) y finales (f) por la fórmula: $\% \text{ de TGI} = [1 - (T_f - T_i) / (C_f - C_i)] \times 100$. Se consideró que los ratones individuales que informaron un volumen tumoral >120 % de la medición del día 0 tenían enfermedad progresiva (PD, por sus siglas en inglés). Se considera que los ratones individuales sin una contracción suficiente ni aumentos
- 15 suficientes del volumen tumoral tienen una enfermedad estable (SD, por sus siglas en inglés). Los ratones individuales que informaron un volumen tumoral ≤70 % de la medición del día 0 durante dos mediciones consecutivas durante un período de siete días se consideraron respondedores parciales (PR, por sus siglas en inglés). Si los PR persistieron hasta la finalización del estudio, se determinó el porcentaje de regresión tumoral usando la fórmula: $\% \text{ de TR} = (1 - T_f / T_i) \times 100$; se calculó un valor medio para todo el grupo de tratamiento. Los ratones individuales que carecieron de
- 20 tumores palpables en dos mediciones consecutivas durante un período de siete días se clasificaron como respondedores completos (CR, por sus siglas en inglés). Todos los datos recopilados en este estudio se administraron electrónicamente y se almacenaron en un sistema de servidor redundante.

Resultados

- 25 **Ensamblaje y caracterización de una cohorte de tumores EP-NET:** Para identificar y dirigirse farmacológicamente a las proteínas MR que presiden el estado de las células EP-NET metastásicas se puede aprovechar una gran recopilación de 211 muestras frescas congeladas en 17 instituciones distintas en América del Norte, Europa y Asia (es decir, The International NET Consortium, iNETCon). La recopilación incluye muestras tanto primarias y
- 30 metastásicas de EP-NET de páncreas (PanNET: 83 y 30 respectivamente), intestino delgado (SI-NET: 44 y 37, respectivamente) y colorrectales (RE-NET: 3 y 15, respectivamente). El ARN total se aisló y se secuenció mediante perfiles con Illumina TruSeq, a una profundidad promedio de 30 M de lecturas SE (Tabla 1).

Tabla 1: Muestras perfiladas de EP-NET, Lecturas del mapeador en millones.

ID de la muestra	Tipo	Origen del tejido	Lecturas mapeadas	ID de la muestra	Tipo	Origen del tejido	Lecturas mapeadas
AC47	Met hepática	Recto	351,3	AC213	Primario	Páncreas	29,5
AC452	Met hepática	Recto	170,8	AC214	Primario	Páncreas	25,3
AC455	Met hepática	Recto	136,2	AC215	Primario	Páncreas	27,3
AC508	Met hepática	Recto	110,6	AC216	Primario	Páncreas	38,8
AC509	Met hepática	Recto	148,2	AC218	Primario	Páncreas	23,7
AC510	Met hepática	Recto	141,9	AC219	Primario	Páncreas	31,2
AC241	Met hepática	Recto	250,5	AC221	Primario	Páncreas	27,3
AC242	Met hepática	Recto	206,7	AC224	Primario	Páncreas	33,4
AC243	Met hepática	Recto	245,3	AC226	Primario	Páncreas	28,5
AC246	Met hepática	Recto	172,6	AC227	Primario	Páncreas	25,6
AC261	Met hepática	Intestino delgado	160,9	AC231	Primario	Páncreas	27,4
AC274	Met hepática	Intestino delgado	179,6	AC233	Primario	Páncreas	28,2
AC534	Primario	Recto	183,8	AC234	Primario	Páncreas	30,8
AC5,35	Primario	Recto	202,7	AC235	Met hepático	Páncreas	28,5
AC100	Primario	Páncreas	32,1	AC236	Primario	Intestino delgado	30,1
AC130	Primario	Páncreas	28,8	AC249	Met hepático	Páncreas	28,7
AC105	Primario	Páncreas	30,4	AC255	Met hepático	Páncreas	34,8
AC106	Primario	Páncreas	28	AC270	Met hepático	Intestino delgado	30,2
AC108	Primario	Páncreas	28,6	AC271	Met hepático	Intestino delgado	40,3
AC110	Primario	Páncreas	32,9	AC273	Met hepático	Intestino delgado	32,6
AC111	Primario	Intestino delgado	25,7	AC276	Met hepático	Páncreas	28,9
AC113	Primario	Intestino delgado	38,6	AC277	Met hepático	Intestino delgado	1,3

ES 2 913 294 T3

AC114	Primario	Páncreas	32,6		AC279	Met hepático	Páncreas	23,7
AC115	Primario	Páncreas	30,9		AC281	Met hepático	Intestino delgado	30,6
AC116	Primario	Páncreas	34,8		AC282	Met hepático	Páncreas	29,5
AC121	Primario	Páncreas	26,1		AC283	Met hepático	Intestino delgado	29,4
AC123	Primario	Páncreas	31,6		AC286	Met hepático	Intestino delgado	32,3
AC125	Primario	Páncreas	34,5		AC288	Met hepático	Intestino delgado	32,8
AC126	Primario	Páncreas	33,3		AC291	Met hepático	Páncreas	35,2
AC127	Primario	Intestino delgado	30,3		AC292	Met hepático	Páncreas	34,3
AC130	Primario	Páncreas	31		AC300	Met hepático	Intestino delgado	29
AC133	Primario	Intestino delgado	25,3		AC301	Met hepático	Intestino delgado	23,4
AC137	Primario	Páncreas	33,8		AC302	Met hepático	Páncreas	32,3
AC139	Primario	Páncreas	32,7		AC305	Met hepático	Páncreas	29,5
AC141	Primario	Intestino delgado	36,3		AC309	Met hepático	Páncreas	37,5
AC143	Primario	Intestino delgado	30,4		AC310	Met hepático	Páncreas	30,6
AC146	Primario	Intestino delgado	24,5		AC312	Met hepático	Páncreas	25,2
AC147	Primario	Intestino delgado	28,7		AC314	Met hepático	Intestino delgado	25,8
AC153	Primario	Páncreas	35,4		AC315	Met hepático	Intestino delgado	30,9
AC157	Primario	Intestino delgado	35,1		AC316	Met hepático	Intestino delgado	34,3
AC158	Primario	Intestino delgado	33,5		AC318	Met hepático	Páncreas	20,1
AC 162	Primario	Intestino delgado	43,8		AC319	Met hepático	Intestino delgado	30,9
AC188	Primario	Intestino delgado	23,9		AC322	Primario	Páncreas	23,2
AC196	Primario	Intestino delgado	15,6		AC323	Primario	Páncreas	25,9
AC199	Primario	Intestino delgado	26,4		AC325	Primario	Páncreas	24,5
AC203	Primario	Intestino delgado	35,5		AC326	Primario	Páncreas	24
AC205	Primario	Intestino delgado	26,8		AC328	Primario	Páncreas	29,2
AC206	Primario	Intestino delgado	28		AC329	Primario	Páncreas	28,9
AC208	Primario	Intestino delgado	25,8		AC333	Primario	Páncreas	35,6'
AC209	Primario	Páncreas	18,6		AC337	Primario	Páncreas	30,3
AC210	Primario	Páncreas	23,9		AC339	Primario	Páncreas	25
AC211	Primario	Páncreas	27,7		AC341	Primario	Páncreas	33,2
AC212	Primario	Páncreas	28,4		AC343	Primario	Páncreas	30,7

Tabla 1 Continuación

ID de la muestra	Tipo	Origen del tejido	Lecturas mapeadas	ID de la muestra	Tipo	Origen del tejido	Lecturas mapeadas
AC346	primario	páncreas	25,5	AC417	primario	intestino delgado	21,9
AC347	primario	páncreas	28,8	AC422	primario	páncreas	32,5
AC348	primario	páncreas	31,9	AC425	primario	páncreas	20,8
AC350	primario	páncreas	23,2	AC429	primario	páncreas	30,5
AC351	primario	páncreas	26,7	AC430	primario	intestino delgado	32,9
AC355	primario	páncreas	34,2	AC431	met. hepática	páncreas	28,4
AC361	primario	páncreas	27,7	AC462	primario	páncreas	27,6
AC363	primario	páncreas	32,5	AC468	primario	intestino delgado	26,6
AC365	primario	páncreas	31,2	AC472	primario	páncreas	309
AC380	primario	páncreas	29,4	AC473	primario	páncreas	30
AC383	primario	intestino delgado	30,7	AC474	primario	páncreas	28,8
AC384	met. hepática	intestino delgado	27,3	AC480	primario	intestino delgado	21,3
AC385	met. hepática	páncreas	26,8	AC483	primario	páncreas	20,8
AC58	met. hepática	páncreas	50,7				
AC60	primario	intestino	38,8				

ES 2 913 294 T3

		delgado	
AC61	met. hepática	intestino delgado	43
AC71	met. hepática	páncreas	32,1
AC73	met. hepática	páncreas	32
AC75	met. hepática	intestino delgado	31,1
AC79	met. hepática	intestino delgado	25,5
AC87	met. hepática	páncreas	32,6
AC89	met. hepática	páncreas	32,8
AC99	primario	intestino delgado	27,8
AC244	met. hepática	intestino delgado	33,6
AC248	met. hepática	intestino delgado	30,3
AC252	met. hepática	intestino delgado	31,3
AC254	met. hepática	páncreas	30,2
AC256	met. hepática	páncreas	28,4
AC257	met. hepática	páncreas	40,2
AC258	met. hepática	páncreas	30,9
AC259	met. hepática	intestino delgado	29
AC262	met. hepática	intestino delgado	29,2
AC263	met. hepática	intestino delgado	30
AC267	met. hepática	intestino delgado	28,3
AC268	met. hepática	intestino delgado	32,3
AC269	met. hepática	páncreas	29,7
AC388	primario	intestino delgado	27,9
AC389	primario	intestino delgado	36,8
AC391	primario	páncreas	24
AC392	primario	intestino delgado	29,5
AC393	primario	páncreas	34,7
AC395	primario	intestino delgado	30
AC397	primario	páncreas	43,1
AC398	primario	páncreas	19
AC399	primario	páncreas	19,5
AC400	primario	páncreas	25,8
AC403	primario	páncreas	23,3
AC405	primario	páncreas	25,9
AC408	primario	páncreas	26,8
AC409	met. hepática	páncreas	26,3
AC410	met. hepática	páncreas	19,8
AC411	primario	páncreas	18,1
			34,2
AC412	primario	páncreas	

AC484	primario	páncreas	22
AC485	primario	páncreas	22,4
AC486	primario	páncreas	26,7
AC487	primario	páncreas	30,1
AC488	primario	páncreas	33,3
AC489	primario	páncreas	28,1
AC490	primario	intestino delgado	27,2
AC494	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	27,5
AC495	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	27,1
AC496	primario	intestino delgado	28,7
AC497	primario	intestino delgado	304
AC498	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	28,3
AC499	met. hepática	páncreas	31,7
AC500	met. hepática	páncreas	31,9
AC539	primario	intestino delgado	28,8
AC540	primario	intestino delgado	35,2
AC541	primario	intestino delgado	27
AC542	primario	intestino delgado	26,6
AC543	primario	intestino delgado	29
AC603	primario	intestino delgado	31,3
AC604	primario	páncreas	30,9
AC606	primario	intestino delgado	21,1
AC607	primario	páncreas	30,7
AC608	primario	páncreas	154
AC609	met. mesentérica	intestino delgado	28,6
AC610	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	27,7
AC611	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	32,3
AC612	primario	intestino delgado	22,7
AC577	primario	recto	158,2
AC578	met. ganglios linfáticos	recto	156,2
AC579	met. ganglios linfáticos	recto	178,1
AC576	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	18,7
AC630	primario	intestino delgado	23,1
AC631	primario	intestino delgado	18,6
AC632	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	19,4
AC633	met. ganglios linfáticos	intestino delgado	13,9
AC636	met. hepática	recto	94,2
AC646	primario	intestino delgado	32,3
AC652	met. ganglios linfáticos	recto	52,1

- 5 Ensamblaje de un modelo regulador específico de EP-NET: La capacidad para identificar proteínas MR depende de la disponibilidad de modelos precisos de regulación específica de tejido, que representan tanto dianas directas de factores de transcripción (TF) como dianas menos indirectas de proteínas de señalización (SP). Se ha demostrado que ambos se pueden inferir de manera eficaz mediante el análisis de grandes conjuntos de datos de perfiles de expresión génica específicos de tumor usando el algoritmo para la reconstrucción precisa de redes celulares (ARACNe)^{19,20}, respaldado por extensos ensayos de validación experimental^{9,11,17,21}.
- 10 El análisis ARACNe de los 211 perfiles RNASeq de EP-NET produjo una red reguladora específica de tumor (interactoma) que comprendía 571.499 interacciones reguladoras entre 5.631 proteínas reguladoras sobre 20.136 genes diana. Las proteínas reguladoras incluyen 1.785 TF y 3.846 SP. A continuación, esta red se usó para evaluar la actividad proteica sobre una base de muestra individual, para un análisis de conglomerados óptimo, así como para dilucidar los reguladores maestros (MR) novedosos de la progresión tumoral.
- 15 La evaluación adicional del interactoma inferido por ARACNe confirmó que es muy relevante para el análisis de muestras específicas de EP-NET y que es sustancialmente distinto de otros interactomas previamente generados y validados, que no habrían sido apropiados para los análisis analizados a continuación (véase la figura 12). Cuando el modelo de red no es representativo de la regulación específica de tejido, el análisis de reguladores maestros produce muy pocos resultados y apenas significativos. Aquí, el interactoma EP-NET produjo el mayor enriquecimiento para
- 20 211 firmas EP-NET en comparación con 24 interactomas adicionales (Tabla 2 y figura 11), lo que indica que EP-NET es el mejor interactoma, entre los 25 ensayados, como modelo para la regulación transcripcional específica del contexto EP-NET.

Tabla 2: Interactomas

Acrónimo	Tipo de tumor	Muestras	Reguladores	Dianas	Interacciones
BRCA	Carcinoma de mama	1.100	6.054	19.359	331.919
UCEC	Carcinoma de endometrio del cuerpo uterino	546	6.055	19.716	469.845
KIRC	Carcinoma de células renales de células claras	534	6.054	19.843	350.478
HNSC	Carcinoma de cabeza y cuello	522	6.055	19.772	423.104
LUAD	Adenocarcinoma de pulmón	517	6.055	19.742	399.513
THCA	Carcinoma de tiroides	509	6.053	19.861	317.582
LUSC	Carcinoma de células escamosas de pulmón	501	6.054	19.741	455.032
PRAD	Adenocarcinoma de próstata	498	6.053	19.820	330.922
COAD	Adenocarcinoma de colon	459	6.056	19.820	413.789
BLCA	Carcinoma urotelial de vejiga	408	6.054	19.785	489.101
LIHC	Carcinoma hepatocelular del hígado	373	6.056	19.829	469.922
CESC	Carcinoma de cuello del útero	306	6.056	19.839	583.961
OV	Carcinoma de ovario	299	6.007	19.140	647.358
KIRP	Carcinoma renal de células papilares renales	291	6.055	19.858	452.653
NET	Tumor neuroendocrino	211	5.631	20.136	571.499
STAD	Adenocarcinoma de estómago	274	6.056	21.663	561.858
SARC	Sarcoma	263	6.112	20.479	526.591
ESCA	Carcinoma de esófago	185	5.951	18.679	529.286
PCPG	Feocromocitoma y paraganglioma	184	6.056	19.861	603.617
LAML	Leucemia mieloide aguda	179	6.007	19.269	531.535
PAAD	Adenocarcinoma de páncreas	179	6.056	19.858	520.756
READ	Adenocarcinoma de recto	167	6.056	19.856	557.911
GBM	Glioblastoma multiforme	166	6.056	19.858	563.850
TGCT	Tumor de células germinales de testículo	156	6.056	19.860	432.621
THYM	Timoma	120	6.056	19.862	387.923

- 25 Identificación de subtipos moleculares de EP-NET: El análisis no supervisado de los perfiles de EP-NET sugiere un fuerte componente de tejido de origen presente en el transcriptoma. Específicamente, el análisis de los primeros 5

componentes principales, basado en el análisis de descomposición de valores singulares (SVD, por sus siglas en inglés) de los datos transcripcionales, capturó el 33 % de la varianza de muestra total y se agrupó parcialmente con el sitio del tumor primario, independientemente de si las muestras representaban tumores primarios, metástasis de los ganglios linfáticos o hepáticas (figura 12A). Esta observación se confirmó adicionalmente basándose en una proyección de incrustación de vecinos estocásticos distribuidos en t (t-SNE) de transcriptomas EP-NET en dos dimensiones (figura 12B). La figura 12A representa gráficos de dispersión que muestran los primeros 5 componentes principales, capturando el 35 % de la varianza para 211 perfiles de expresión de EP-NET. El tejido de origen se indica con diferentes colores. Los tumores primarios se muestran con círculos, mientras que los MET se muestran con triángulos. La figura 12B representa una proyección 2D-tSNE para los datos de expresión. Diferentes colores indican los diferentes tejidos de origen. La figura 12C representa una proyección 2D-tSNE de la actividad proteica inferida por VIPER para 211 muestras de EP-NET. El color de los símbolos indica el tejido de origen, su forma indica su estado como tumor primario (círculos) o MET (triángulos). El color de las nubes indica la pertenencia al conglomerado según la figura 7B.

De manera consistente, el agrupamiento de consenso basado en la partición alrededor de medoides (PAM, por sus siglas en inglés), seguido del análisis de fiabilidad del conglomerado, sugirió una partición óptima de las muestras en cuatro conglomerados que también se cosegregaron parcialmente con el sitio del tumor primario (figuras 13C y figura 7A). Específicamente, los conglomerados 1 - 3 estaban muy enriquecidos en muestras SI-NET, Pan-NET y Rec-NET, respectivamente, mientras que los conglomerados 4 incluían muestras de SI-NET y Pan-NET (figura 7A).

La figura 13A representa el gráfico de densidad de probabilidad para la fiabilidad del conglomerado estimada a partir de los perfiles de expresión y los perfiles de actividad proteica inferida por VIPER para 211 muestras de EP-NET (véase la figura 13D). La figura 13B representa la puntuación de fiabilidad integrada para la estructura de conglomerados completa calculada como el área sobre la curva de probabilidad acumulada. La figura 13C representa la puntuación de fiabilidad integrada para diferentes estructuras de conglomerados (diferente número de conglomerados) para el conglomerado de consenso de 211 perfiles de la expresión de EP-NET ("1301") o de actividad proteica inferida por VIPER ("1302"). La figura 13D representa la puntuación de fiabilidad de conglomerados para 211 perfiles de expresión de EP-NET y de actividad proteica inferida por VIPER después del conglomerado de consenso en 4 y 5 conglomerados, respectivamente. La línea de color negro horizontal indica el umbral para FDR <0,01. Las figuras 13E y 13F representan la fiabilidad del conglomerado (E) y la puntuación de silueta (F) para cada muestra de la estructura de 4 conglomerados basada en la expresión y la estructura de 5 conglomerados basada en datos de la actividad proteica inferida por VIPER. La figura 13G representa la pertenencia a conglomerados para el modelo de xenoinjerto H-STS. Se muestra el enriquecimiento de las muestras de cada uno de los 5 conglomerados en la distancia con respecto al modelo de xenoinjerto basado en la correlación entre las firmas de actividad proteica. La importancia del enriquecimiento se muestra como $-\log_{10}(\text{valor de } p)$ mediante el gráfico de barras.

La actividad proteica, inferida de las lecturas del transcriptoma de una sola muestra usando VIPER, puede ser un descriptor más sólido del estado celular que la expresión génica¹⁸. La razón es triple. En primer lugar, la actividad proteica inferida por VIPER representa un determinante más directo y mecánico del estado celular, en comparación con la expresión génica; en segundo lugar, mientras que las mediciones de la expresión génica individuales son bastante desproporcionadas y poco reproducibles, VIPER infiere la actividad proteica a partir de la expresión de un gran número (de decenas a cientos) de sus dianas transcripcionales (es decir, el regulón de la proteína), lo que da como resultado mucha mayor precisión y reproducibilidad¹⁸; en tercer lugar, el sesgo y el ruido técnico que es inconsistente con el modelo regulador se filtran de manera eficaz, eliminando así una fuente importante de datos confusos. El interactoma EP-NET se puede usar para transformar los 211 perfiles transcripcionales individuales en perfiles de actividad proteica equivalentes para 5.578 de las proteínas reguladoras representadas en la red, usando VIPER¹⁸.

La actividad proteica inferida por VIPER fue eficaz en la segregación de muestras según el tejido de origen. Tanto el análisis de conglomerados de consenso basado en PAM no supervisado como la proyección t-SNE de los datos de actividad proteica en el espacio bidimensional identificaron 5 conglomerados fuertemente distintos que representaban los subtipos de EP-NET molecularmente distintos (figuras 7B y 12C). Estos incluían un conglomerado específico de SI-NET (C1: "701" en la figura 7B y "1201" en la figura 12C), un conglomerado específico de Pan-NET (C3: "703" en la figura 7B y "1203" en la figura 12C), un conglomerado de Rec-NET (C4: "704" en la figura 7B y "1204" en la figura 12C), y dos conglomerados heterogéneos que incluían principalmente muestras de Pan-NET y SI-NET (C2: "702" en la figura 7B y "1202" en la figura 12C; y C5: "705" en la figura 7B y "1205" en la figura 12C), véanse las figuras 7B y 12C. Se usó el mismo esquema de color para representar las muestras pertenecientes a estos conglomerados en la proyección t-SNE, destacando así una estructura de agrupamiento esencialmente equivalente por ambos enfoques de análisis no supervisados (figuras 7B y 12C). La figura 7A muestra los resultados de un análisis de conglomerados no supervisado de 211 muestras de EP-NET basándose en su perfil de expresión génica. El mapa de calor muestra el coeficiente de correlación de Pearson ponderado. Las muestras se dividieron en 4 conglomerados y se clasificaron según su puntuación de silueta (indicada por las barras de color a la derecha del mapa de calor). Cada puntuación de silueta promedio de conglomerado se indica mediante números. El tejido de origen se indica en la barra horizontal superior: recto (rojo; "1206" en las figuras 12A y 12B), intestino delgado (verde; "1207" en las figuras 12A y 12B) y páncreas (azul; "1208" en las figuras 12A y 12B). El nivel de expresión (RPKM) de gastrina, glucagón, insulina, somatostatina y VIP se indica en el mapa de calor inferior. La figura 7B muestra los resultados de un análisis de

conglomerados no supervisado basado en la actividad proteica inferida por VIPER para 5.578 proteínas reguladoras. El mapa de calor muestra la puntuación de similitud escalada calculada por la técnica aREA.

5 El análisis de fiabilidad de los conglomerados confirmó que los conglomerados basados en la actividad proteica superaron significativamente al agrupamiento basado en la expresión génica más desproporcionado (figuras 13C-13F; $p < 10^{-15}$, prueba U). Además de los conglomerados más fiables obtenidos a partir de la actividad proteica, las estructuras de ambos conglomerados eran notablemente similares (índice de Rand ajustado: 0,57, $p < 10^{-5}$ por prueba de permutación). Curiosamente, los tumores Pan-NET se dividieron en tres conglomerados distintos, de acuerdo con la posible célula de origen, incluyendo NET de gastrinoma, insulinoma ("702"), glucagonoma ("703") y de páncreas no secretor ("705") (figura 7B). Estos resultados respaldan claramente una fuerte memoria epigenética del tejido de origen en los EP-NET, independientemente del estadio del tumor.

15 Inferencia de proteínas MR de progresión metastásica: Para identificar proteínas reguladoras maestras responsables del fenotipo de progresión metastásica (MET), el interactoma EP-NET puede interrogarse con firmas de expresión génica que representan la transición del estado celular entre tumores primarios y metástasis hepáticas (MET-GES). Clínicamente, la progresión metastásica al hígado determina una transición a una forma intratable de la enfermedad, asociada con mal pronóstico. Como se ha mostrado previamente, algunas de estas proteínas MR representarían dependencias tumorales críticas asociadas con la forma metastásica de la enfermedad, que pueden ser atacadas farmacológicamente.

20 Para explicar directamente la heterogeneidad potencial de los mecanismos de progresión tumoral, así como para respaldar el enfoque específico del paciente propuesto para dilucidar las dependencias de MR y los inhibidores de moléculas pequeñas asociados, se analizaron 69 muestras metastásicas de forma individual. Específicamente, las firmas MET-GES individuales se generaron mediante análisis de expresión diferencial de cada muestra de metástasis hepática en un conglomerado (es decir, C1 - C5) frente al promedio de todas las muestras primarias en ese conglomerado (figura 7B). 3 de las 211 muestras no se pueden agrupar de forma fiable (FDR de fiabilidad del conglomerado $> 0,01$), incluyendo 1 tumor primario de páncreas y 2 tumores primarios de intestino delgado. Estas muestras no se consideraron para análisis posteriores. A continuación se analizaron MET-GES individuales usando VIPER, frente al interactoma EP-NET, para identificar las proteínas MR responsables de regular directamente el cambio en el repertorio de expresión génica durante la progresión metastásica.

30 Los MR de progresión metastásica se conservaron notablemente tanto dentro como a través de los conglomerados moleculares C1 - C5. De hecho, los 25 MR más activados y los 25 más inactivados, identificados a partir de cada firma de progresión metastásica, estaban muy enriquecidos en la clasificación global de la actividad proteica inferida por VIPER de otras firmas MET-GES. Específicamente, 1.416 de los 2.346 posibles pares de muestras metastásicas mostraron una superposición de MR significativa (FDR $< 0,01$) (figuras 8A y 12A).

40 El análisis de conglomerados de consenso no supervisado respalda la presencia de cuatro conglomerados distintos (MC1 - MC4) que representan mecanismos de progresión metastásica altamente conservados pero distintos (figura 8A), compartiendo cada uno un gran subconjunto de MR comunes (figura 8B). La figura 8A representa un mapa de calor que muestra la conservación de las 50 proteínas más desreguladas en asociación con la metástasis hepática entre cada par de muestras posible. Las muestras se dividieron en 4 conglomerados en función de la conservación de los impulsores de metástasis y se clasificaron según la puntuación de silueta. El tejido de origen está indicado por la primera barra de color: recto (rojo), intestino delgado (verde) y páncreas (azul). Los conglomerados correspondientes a la figura 7B se indican con los mismos colores en la segunda barra de color. La figura 8B representa un mapa de calor que muestra la actividad proteica relativa de las 20 proteínas más desreguladas de cada uno de los cuatro conglomerados. Las barras de color de la derecha indican el origen del tejido y la correspondencia con los cinco conglomerados representados en la figura 7B. La puntuación de silueta de muestra única y el promedio de conglomerados se indican a la derecha del gráfico.

50 De manera interesante, al comparar los 5 conglomerados de subtipos moleculares con los cuatro conglomerados de progresión tumoral, hubo una asociación muy débil entre ellos, agrupándose la mayoría de las muestras de C1 en MC5, que se enriqueció en SI-NET, y cayendo la mayoría de las muestras de C4 en MC1, que se enriqueció en Rec-NET. Sin embargo, los tres conglomerados de MC estaban compuestos por muestras de diferentes subtipos, lo que respalda que los mecanismos de progresión metastásica están en gran medida desacoplados del sitio del tumor primario y la identidad del subtipo.

Selección de modelos *in vitro* apropiados para la validación de MR y creación de perfiles de fármacos:

60 La validación de MR experimental en base a una muestra individual requiere la disponibilidad de modelos *in vitro* e *in vivo* apropiados. Esto es especialmente relevante para evaluar si el análisis de muestras obtenidas de pacientes puede dilucidar compuestos de molécula pequeña que puedan anular la viabilidad tumoral *in vivo* al inducir la inversión de la actividad de MR (es decir, el colapso del punto de control tumoral). Los EP-NET se caracterizaron por la escasez de modelos de alta fidelidad disponibles, incluyendo tanto líneas celulares como xenoinjertos. Se consideraron cinco líneas celulares obtenidas de pacientes con EP-NET que se caracterizaron previamente en la bibliografía y se demostró que presentaban determinadas características, incluyendo la expresión del receptor de cromogranina A y

de somatostatina II, lo que representa el sello distintivo de estos tumores. Específicamente, se consideraron tres líneas celulares isogénicas aisladas de un solo paciente con SI-NET, incluyendo del tumor primario (P-STs), de una metástasis en los ganglios linfáticos (L-STs) y de una metástasis hepática (H-STs)²², una línea celular adicional aislada de un paciente con SI-NET distinto (KRJ-I)²³, y una línea celular de un adenocarcinoma del ciego mal diferenciado con características neuroendocrinas (NCI-H716).

Para evaluar el valor de estas líneas celulares como modelos *in vitro* para las metástasis de pacientes individuales representadas en el conjunto de datos, se realizó un análisis de MR de MET específico de la línea celular generando una firma de progresión de MET-GES para cada línea celular metastásica frente a la línea celular P-STs, como representante de un tumor primario. Se puede realizar un cálculo para determinar si los 100 MR principales de cada paciente estaban enriquecidos en la firma de actividad de MR de cada línea celular mediante la técnica aREA¹⁸.

Los MR para 20 de las 69 muestras metastásicas obtenidas de pacientes se recapitulaban significativamente por las líneas celulares EP-NET disponibles. La línea celular H-STs es de particular interés porque se obtiene de una lesión metastásica mientras que la línea isogénica P-STs se estableció a partir del tumor NET primario. H-STs recapituló los MR de 17 tumores (p ajustada de Bonferroni $<10^{-1}$, figura 9A). En particular, recapituló los MR de una gran mayoría de muestras de RE-NET (8/11, 73 %), y de algunas muestras de SI-NET (2/28, 7,1 %) y Pan-NET (7/30, 23 %), incluyendo los MR de un paciente con Pan-NET de interés (P0) en los que se basa el análisis oncoTreat (figuras 9A y 9B). Se seleccionó con fines comparativos un paciente cuyos MR no se recapitulaban adecuadamente por la línea celular H-STs (P1, figura 9C). La figura 9A representa el enriquecimiento de las 100 proteínas más desreguladas de cada metástasis en cada línea celular y la firma de la actividad proteica del modelo de xenoinjerto H-STs. La barra de color en la parte superior del gráfico indica el tejido de origen del tumor primario. Los triángulos de color azul indican dos metástasis Pan-NET (paciente 0 y paciente 1) para las cuales se muestra un gráfico detallado de este análisis en los paneles B a E. Las figuras 9B-9E representan los resultados del análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes para las 50 proteínas más activadas y las 50 proteínas más desactivadas en cada metástasis seleccionada en la firma de actividad proteica de la línea celular H-STs (B y C), y el modelo de xenoinjerto H-STs (D y E). Las curvas muestran la puntuación de enriquecimiento para las proteínas desactivadas ("901") y activadas ("902") en la metástasis. Las 50 proteínas más desreguladas en la metástasis se indican mediante líneas verticales proyectadas en las firmas de actividad proteica de H-STs y del xenoinjerto, que se indican mediante la escala de colores en la parte inferior del gráfico.

El análisis del transcriptoma de un modelo de xenoinjerto H-STs indicó una clara similitud con el conglomerado molecular C5 ("705" en la figura 7B y "1205" en la figura 12C) (véase la figura 13G). De manera interesante, este modelo de xenoinjerto recapituló los MR de metástasis de 32 de los 69 tumores metastásicos, incluyendo el 73 % de RE-NET (8 tumores), el 32 % de SI-NET (9 tumores) y el 50 % de Pan-NET (15 tumores) (figuras 9A, 9D y 9E).

Inferencia sistemática de inhibidores de la actividad de MR: Para identificar compuestos de molécula pequeña candidatos capaces de anular la firma de actividad de MR que impulsa la progresión metastásica, se interrogó una biblioteca de 504 compuestos previamente cribados en el Broad Institute, Cambridge, MA, para determinar la actividad diferencial frente a un panel de 242 líneas celulares de cáncer (CCL) caracterizadas genómicamente, de las cuales 354 habían sido publicadas previamente⁶. Los 504 compuestos se volvieron a cribar en las líneas celulares de tumores neuroendocrinos disponibles, incluidas H-STs, L-STs, P-STs, KRJ-I y NCI-H716. Se seleccionaron los 108 compuestos con mayor actividad diferencial en células relacionadas con NET en comparación con las otras 242 CCL, en función de su actividad diferencial en la viabilidad celular, según lo medido por el área bajo la curva de respuesta a la dosis (AUC). Las curvas de respuesta a la dosis para estos compuestos se repitieron en las instalaciones de HTS en la Universidad de Columbia y se compararon con las generadas en Broad. En general, estos estudios presentaron una superposición notable con una correlación AUC de Spearman de 0,71 ($p = 1 \times 10^{-1}$).

Para evaluar la capacidad de estos compuestos para inducir el colapso del punto de control tumoral (es decir, la inversión global del patrón de actividad de MR obtenido del paciente), se generaron perfiles de expresión génica 6 h y 24 h después de la perturbación de las células H-STs con dos concentraciones subletales del compuesto, la CI_{20} a las 72 h y $1/10^0$ de esa concentración por duplicado. El punto temporal de 24 h se consideró más informativo para la respuesta a largo plazo. Estos se produjeron creando un perfil Illumina TruSeq de 30 M de lecturas SE de ARN purificado de células tratadas, así como de células tratadas con medio de control (DMSO). Esto garantizó que se pudiera ensayar la concentración más alta del compuesto que no indujera procesos de muerte celular y, por lo tanto, que recapitulara fielmente el mecanismo de acción (MoA) del compuesto en lugar de los mecanismos y programas asociados con la muerte celular. Si bien los criterios de valoración fenotípicos *in vivo* (por ejemplo, la viabilidad del tumor) no se recapitulan de manera eficaz en cultivos 2D *in vitro*, el MoA del compuesto se recapitula razonablemente bien en ambos contextos. Un objetivo puede ser identificar compuestos capaces de invertir la firma de actividad de MR *in vitro* en un modelo relativamente fiel del contexto regulador del tumor, para evaluar si estos compuestos tendrían actividad *in vivo*.

Las firmas farmacológicas se analizaron con VIPER para evaluar el cambio en la actividad proteica antes y después de la perturbación. Específicamente, se generaron RX-GES mediante la expresión diferencial de células tratadas con compuesto frente a células tratadas con vehículo de control en todos los puntos temporales y concentraciones y se analizaron con VIPER frente al interactoma EP-NET. Esto clasificó las 5.602 proteínas reguladoras representadas en

el interactoma, desde aquella cuya actividad se inhibió más hasta aquella cuya actividad aumentó más después de la perturbación farmacológica. Se realizó un análisis aREA de muestras de pacientes que estaban bien representadas por el modelo de xenoinjerto H-STS para evaluar el enriquecimiento de los MR de progresión metastásica en proteínas cuya actividad estaba más invertida después de la perturbación farmacológica. Dado que la validación de estas predicciones se realizó en modelos de xenoinjerto de ratón H-STS, el análisis se limitó a cada MR de NET-MET que se recapituló en el xenoinjerto H-STS. Esto no compromete la generalidad de la metodología. Más bien, permiten un ajuste óptimo de los resultados con respecto a los modelos. Más bien, permiten un ajuste óptimo de los resultados a los modelos *in vitro* e *in vivo* disponibles para un diseño óptimo de los ensayos de validación. Por lo tanto, la metodología OncoTreat usa la capacidad de priorizar compuestos de molécula pequeña que revierten de manera óptima una firma de actividad de MR específica del paciente.

Se identificaron tres fármacos que revirtieron significativamente la actividad MET-MR específica del paciente seleccionado (P0, véase la figura 6A) y del xenoinjerto H-STS (p ajustada de Bonferroni $<10^{-1^*}$), incluyendo el inhibidor de HDAC1/3 (entinostat), el inhibidor de bromodominio de proteína (I-BET151) y el inhibidor de NF- κ B (bardoxolona metilo). Entre ellos, el entinostat mostró la reversión más significativa tanto en el programa MET-MR del paciente 0 recapitulado por el modelo de xenoinjerto H-STS, como en los MR del modelo de xenoinjerto (figuras 10A-10C). La figura 15 muestra los resultados de oncoTreat (u oncoMatch) para 46 compuestos seleccionados en el paciente 0, xenoinjerto H-STS y 31 tumores adicionales cuyos MR se mostraron recapitulados por el modelo de xenoinjerto H-STS (véase la figura 9A). La figura 15 representa el enriquecimiento de las 50 proteínas más activadas (mostradas en color rojo en los gráficos de enriquecimiento) y las 50 proteínas más desactivadas (mostradas en color azul) en el paciente 0 en la firma de actividad proteica inducida por cada perturbación compuesta en la línea celular H-STS. El mapa de calor muestra la significación estadística para la reversión de MR, expresada como $-\log_{10}$ (valor de p), cuantificada por la técnica aREA al medir el enriquecimiento de cada una de las 32 muestras de tumor y MR de muestra de xenoinjerto en la firma de actividad proteica provocada por la perturbación compuesta de las células H-STS. La barra de color indica el tejido de origen de cada uno de los tumores evaluados.

Validación farmacológica *in vivo*: Las células H-STS se injertan eficazmente en ratones atímicos y la RNASeq de los tumores de xenoinjertos resultantes mostró una superposición notable con los MR obtenidos de pacientes (figuras 9A y 9D). Se seleccionaron seis compuestos para la validación *in vivo* (figura 10A), incluyendo dos compuestos que anulan significativamente la actividad de los MR del paciente 0 y del xenoinjerto: Entinostat (el compuesto de mayor prioridad) e I-BET151, un inhibidor de bromodominio; un compuesto que revierte los MR del paciente 0 pero no los MR del xenoinjerto: bardoxolona metilo, un activador del estrés oxidativo/inhibidor de NE κ B; un compuesto que revierte el xenoinjerto pero no los MR del paciente 0: tivantinib, un inhibidor de c-Met con actividad complementaria como inhibidor de microtúbulos; y un compuesto que no muestra una reversión significativa de los MR del paciente 0 o del xenoinjerto: PDX101 (belinostat), un inhibidor de pan-HDAC. El último compuesto se seleccionó entre los que no mostraban actividad porque, desde una perspectiva farmacológica, debería tener efectos similares al entinostat y, sin embargo, se predijo que los dos compuestos estarían en el extremo opuesto de la actividad de reversión de la firma de MR.

La validación *in vivo* en xenoinjertos de ratones NOD-SCIDS establecidos mediante inyección subcutánea de células H-STS se realizó primero en Champions Oncology y a continuación se confirmó de forma independiente en las instalaciones del hospital de ratones en la Universidad de Columbia. Los ratones se incluyeron en los grupos de tratamiento cuando el tamaño del tumor alcanzó 250 mm³ y se trataron durante 25 días. El tamaño del tumor se midió dos veces por semana con un calibrador digital, véanse los procedimientos. Si bien se observó una leve inhibición del crecimiento tumoral (TGI) con niveles altos de tivantinib (43 % de TGI a 200 mg/kg/dosis y 28 % de TGI a 100 mg/kg/dosis), el tumor siguió progresando, aunque a un ritmo más lento que los controles. Los tumores tratados con belinostat mostraron una TGI mínima, con solo un 8 % de TGI a nivel de 20 mg/kg/dosis. En marcado contraste, el tratamiento con entinostat mostró altos niveles de regresión tumoral (TR), con un 68 % de TR y un 112 % de TGI a 25 mg/kg/dosis y un 58 % de TR y un 110 % de TGI a 50 mg/kg/dosis. El tratamiento con entinostat fue tóxico a 100 mg/kg/dosis; sin embargo, el único animal superviviente de ese grupo mostró una regresión tumoral del 49 %. Estos resultados se resumen en la Tabla 3 y la figura 10B.

Tabla 3: Volumen tumoral y datos de actividad del agente

Grupo	% de TGI	RECIST PD/SD/PR/CR *	% de TR
Control		3/0/0/0	n/d
ARQ197 200 mg	43 %	3/0/0/0	n/d
ARQ197 100 mg	28 %	3/0/0/0	n/d
ARQ197 50 mg	-46 %	3/0/0/0	n/d
PDX101 20 mg	8 %	3/0/0/0	n/d
PDX101 40 mg	-55 %	3/0/0/0	n/d
MS-27-275 25 mg	112 %	0/0/3/0	68

Grupo	% de TGI	RECIST PD/SD/PR/CR *	% de TR
MS-27-275 50 mg	110 %	0/0/3/0	58
MS-27-275 100 mg**	n/d	0/0/1/0	49

*PD-Enfermedad progresiva; SD-Enfermedad estable; PR-Respuesta parcial; CR-Respuesta completa**Cuatro de cinco animales murieron una semana después de la prueba, probablemente como resultado de la toxicidad farmacológica; los resultados son representativos del único animal superviviente

Los estudios de seguimiento en Columbia confirmaron la observación original para entinostat, con una anulación completa del crecimiento tumoral (figura 10C). Se observó una débil reducción en el crecimiento tumoral para bardoxolona metilo solo en los dos últimos puntos temporales evaluados y ninguna diferencia significativa en comparación con el control de vehículo para I-BET151 y bortezomib (figura 10C). De acuerdo con el efecto de la perturbación compuesta *in vitro* (figura 10A), el análisis del transcriptoma del xenoinjerto 3 horas después de la 3ª administración del fármaco indicó una fuerte inhibición de la actividad proteica del punto de control del paciente 0 por entinostat, I-BET151 y bardoxolona metilo, y ningún efecto de bortezomib (figura 10D). De manera similar, el mismo análisis mostró una inhibición significativa del punto de control del xenoinjerto H-STS solo por entinostat. Esto está en consonancia con el efecto deficiente de la bardoxolona metilo, I-BET151 y bortezomib sobre el crecimiento del tumor del xenoinjerto y la fuerte anulación provocada por entinostat (figuras 10B y 10C). En resumen, mientras que el efecto de entinostat, I-BET151 y bardoxolona metilo en la reversión de la actividad del punto de control del paciente 0 inferida del ensayo de perturbación de H-STS *in vitro* se confirmó en el modelo de xenoinjerto, solo entinostat revirtió la actividad de los puntos de control del xenoinjerto H-STS y anuló el crecimiento tumoral (figura 10).

La figura 10A representa el enriquecimiento de los MR de punto de control de metástasis del paciente 0 en las firmas de actividad proteica inducidas por 6 compuestos seleccionados en las células H-STS. Las figuras 10B y 10C representan las curvas de crecimiento para el xenoinjerto H-STS mientras se trata con control de vehículo y cada uno de los 6 compuestos seleccionados. Las curvas muestran el volumen tumoral para animales individuales (figura 10B) o la media \pm SEM de 8 animales (figura 10C). La figura 10D representa el enriquecimiento del punto de control de metástasis del paciente 0 en las firmas de actividad proteica inducidas por 4 compuestos seleccionados en el xenoinjerto H-STS. La figura 10E representa el enriquecimiento del punto de control del xenoinjerto H-STS en las firmas de actividad proteica inducidas por 4 compuestos seleccionados en el xenoinjerto H-STS.

25 *Análisis*

A pesar del éxito, el paradigma de la adicción a oncogenes¹ ha mostrado desafíos crecientes que incluyen una cantidad cada vez menor de nuevas dianas accionables de alta penetrancia identificables por alteraciones genéticas en secuencias tumorales, falta de mutaciones accionables en la mayoría de los pacientes con cáncer y alta frecuencia de recaída después de la terapia dirigida. De hecho, solo del 5 % al 11 % de los pacientes experimentan un aumento de la supervivencia libre de progresión cuando son tratados con inhibidores dirigidos en función de la genética del tumor (comunicación personal de Mardis).

Ciertos resultados han revelado la existencia de una nueva clase de proteínas (reguladores maestros) responsables de implementar mecánicamente la firma transcripcional de un tumor específico. Las proteínas MR se pueden identificar de manera eficiente mediante un análisis basado en redes reguladoras, incluso en base a pacientes individuales¹⁸, a pesar de que rara vez mutan o se expresan diferencialmente. Este ejemplo respalda que la evaluación imparcial de fármacos aprobados por la FDA y compuestos en investigación en términos de su capacidad para revertir las firmas de actividad de MR específicas del paciente, usando el análisis OncoTreat, es eficaz para priorizar compuestos que puedan anular la viabilidad del tumor *in vivo*.

La metodología OncoTreat se ensayó en un tipo de tumor raro (EP-NET), que notoriamente carece de alteraciones susceptibles de tratamiento y está mal caracterizado en la bibliografía. Esta elección fue deliberada para mostrar que el enfoque propuesto se puede aplicar de manera eficiente e imparcial incluso a tumores para los que se dispone de poca información a nivel molecular. De hecho, el componente más complejo de los análisis presentados en este ejemplo fue la recopilación y el perfil de una gran cantidad de tumores EP-NET de 17 centros colaboradores para proporcionar datos adecuados para ensamblar el modelo regulador y para interrogarlo con firmas de progresión metastásica. Sin embargo, la metodología OncoTreat fue completamente generalizable y se ensaya en un estudio mucho más amplio que incluye 14 tumores malignos raros e intratables.

Los ensayos de validación confirmaron que los fármacos que se predijo que tenían una actividad alta, media y nula en la reversión de la firma de MR produjeron regresión tumoral, reducción del crecimiento tumoral y ningún efecto, respectivamente, validando así sustancialmente el enfoque. Sorprendentemente, todos estos compuestos se priorizaron en función de su alta toxicidad diferencial en las líneas celulares EP-NET, lo que confirma que la toxicidad *in vitro* no es un buen predictor de la actividad *in vivo*, ni siquiera cuando se usa la misma línea celular en ambos ensayos. También es importante tener en cuenta que los principales fármacos priorizados por el análisis de perfil perturbacional basado en VIPER indujeron una reversión profunda de prácticamente las 50 proteínas reguladoras

maestras principales (es decir, de todo el módulo de punto de control tumoral). Dado que es poco probable que estos compuestos puedan representar inhibidores y activadores específicos de dichos conjuntos de proteínas grandes y únicos, esto respalda que los puntos de control tumorales representan módulos estrechamente autorregulados que pueden desactivarse globalmente mediante una intervención farmacológica. Esto se había informado previamente, por ejemplo, mediante el silenciamiento mediado por ARNi de pares de MR sinérgicos en glioma⁹ y cáncer de próstata¹⁰, que provocó el colapso de todo el módulo de MR. Por lo tanto, estos análisis presentados en este Ejemplo confirman aún más el papel crítico de los módulos de puntos de control tumorales como interruptores reguladores responsables de mantener la estabilidad del estado tumoral.

Dado que la metodología OncoTreat prioriza la actividad del compuesto en función de las firmas de MR específicas del paciente, los fármacos priorizados se acoplan naturalmente con biomarcadores basados en MR para la selección de cohortes de respondedores frente a no respondedores. De manera interesante, como se muestra para los tumores EP-NET, los pacientes se agruparon en un puñado de subtipos, cada uno de los cuales presentaba un perfil de actividad de MR prácticamente idéntico. Esto respalda un potencial para terapias más universales, a pesar de la heterogeneidad del tumor a nivel genético. Como resultado, la metodología OncoTreat se puede adaptar a la generación eficiente de diseños de estudios en cesto, donde los pacientes pueden asignarse a diferentes grupos de tratamiento según su firma de MR específica.

Si un paciente que respondió a la terapia dirigida se agrupa eficazmente dentro de un número relativamente pequeño de firmas de MR distintas, esto respalda que una vez que se haya ensayado un número suficiente de modelos PDX para cada subtipo, se puede determinar el tratamiento para pacientes adicionales sobre la base de una respuesta previa en modelos PDX que representan una coincidencia cercana para la firma de actividad de MR del paciente. Además, la capacidad de cribar el compuesto *in vitro* puede llevar a evaluar la actividad del compuesto eficaz para revertir las firmas de actividad de MR, pero en concentraciones que no son fisiológicamente alcanzables. Esto se puede abordar, por ejemplo, estudiando la PD con el compuesto *in vivo* a las dosis máximas toleradas, analizando los patrones de expresión génica de los compuestos más priorizados después de la perturbación *in vivo* de los xenoinjertos tumorales. Esto también abordaría posibles problemas relacionados con la actividad diferencial del compuesto *in vitro* e *in vivo*, aunque el mecanismo de acción del compuesto, a diferencia del criterio de valoración fenotípico, está relativamente bien conservado en estos contextos.

Conclusión

Como se muestra en este Ejemplo, la metodología OncoTreat u OncoMatch es un enfoque basado en ARN altamente innovador y ampliamente aplicable para la medicina del cáncer de precisión. Proporciona un marco completo y validado experimentalmente para priorizar las estrategias terapéuticas sobre una base de pacientes individuales. Específicamente, las estrategias terapéuticas se priorizan mediante la identificación simultánea de las dependencias tumorales críticas y los fármacos que se adaptan de manera óptima para anular su actividad, a través del análisis de redes reguladoras específicas del contexto. Esta metodología se ha probado en un contexto de tumores raros, los tumores neuroendocrinos enteropancreáticos, con una validación completa *in vivo* de las estrategias terapéuticas.

LISTA DE REFERENCIAS

- 1 Weinstein, I. B. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science* 297, 63-64 (2002).
- 2 Commo, F. et al. Impact of centralization on aCGH-based genomic profiles for precision medicine in oncology. *Ann Oncol* 26, 582-588 (2015).
- 3 MacConaill, L. E. et al. Prospective Enterprise-Level Molecular Genotyping of a Cohort of Cancer Patients. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* (2014);16(6):660-72.
- 4 Jang, S. & Atkins, M. Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *Lancet Oncol.* 14(2), e60-69 (2013).
- 5 Davoli, A., Hocevar, B. A. & Brown, T. L. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 65, 611-623 (2010).
- 6 Basu, A. et al. An interactive resource to identify cancer genetic and lineage dependencies targeted by small molecules. *Cell* 154, 1151-1161 (2013).
- 7 Compagno, M. et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459, 717-721 (2009).
- 8 Bisikirska, B. et al. Elucidation and Pharmacological Targeting of Novel Molecular Drivers of Follicular Lymphoma Progression. *Cancer Res* (2016);76(3):664-74.
- 9 Carro, M. S. et al. The transcriptional network for mesenchymal transformation of brain tumours. *Nature* 463, 318-325 (2010).
- 10 Aytes, A. et al. Cross-species regulatory network analysis identifies a synergistic interaction between FOXM1 and CENPF that drives prostate cancer malignancy. *Cancer Cell* 25, 638-651 (2014).
- 11 Mitrofanova, A., Aytes, A., Shen, C., Abate-Shen, C. & Califano, A. A systems biology approach to predict drug response for human prostate cancer based on *in vivo* preclinical analyses of mouse models. *Cell Reports* 12, 1-12 (2015).
- 12 Rodriguez-Barrueco, R. et al. Inhibition of the autocrine IL-6-JAK2-STAT3-calprotectin axis as targeted therapy for HR-/HER2+ breast cancers. *Genes Dev* 29, 1631-1648 (2015).

- 13 Piovan, E. et al. Direct reversal of glucocorticoid resistance by AKT inhibition in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 24, 766-776 (2013).
- 14 Chen, J. C. et al. Identification of Causal Genetic Drivers of Human Disease through Systems-Level Analysis of Regulatory Networks. *Cell* 159, 402-414 (2014).
- 5 15 Luo, J., Solimini, N. L. & Elledge, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823-837 (2009).
- 16 Schreiber, S. L. et al. Towards patient-based cancer therapeutics. *Nat Biotechnol* 28, 904-906 (2010).
- 17 Lefebvre, C. et al. A human B-cell interactome identifies MYB and FOXM1 as master regulators of proliferation in germinal centers. *Mol Syst Biol* 6, 377 (2010).
- 10 18 Alvarez, M. J. et al. Functional characterization of somatic mutations in cancer using network-based inference of protein activity. *Nat Genet* (2016);48(8): 838:847.
- 19 Basso, K. et al. Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* 37, 382-390 (2005).
- 20 Margolin, A. A. et al. ARACNE: an algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context. *BMC bioinformatics* 7 Suppl 1, S7 (2006).
- 15 21 Basso, K. et al. Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* 115, 975-984 (2010).
- 22 Pfragner, R. et al. Establishment and characterization of three novel cell lines - P-STC, L-STC, H-STC - derived from a human metastatic midgut carcinoid. *Anticancer Res* 29, 1951-1961 (2009).
- 20 23 Pfragner, R. et al. Establishment of a continuous cell line from a human carcinoid of the small intestine (KRJ-I). *International journal of oncology* 8, 513-520 (1996).

Además de las diversas realizaciones representadas y reivindicadas, la materia objeto descrita también se refiere a otras realizaciones que tienen otras combinaciones de las características descritas y reivindicadas en esta invención. Como tal, las características particulares presentadas en esta invención se pueden combinar entre sí de otras maneras dentro del alcance de la materia objeto descrita, de modo que la materia objeto descrita incluya cualquier combinación adecuada de las características descritas en esta invención. La descripción anterior de realizaciones específicas de la materia objeto descrita se ha presentado con fines ilustrativos y descriptivos. No pretende ser exhaustiva ni limitar la materia objeto descrita con respecto a las realizaciones descritas.

25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para cribar un compuesto que trata una enfermedad o trastorno, que comprende:

- 5 medir cuantitativamente la actividad proteica de una pluralidad de proteínas reguladoras maestras en una muestra de dicha enfermedad o trastorno, donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se basa directa o indirectamente en la expresión de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, y donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras comprende inferir computacionalmente la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras a partir de perfiles de expresión génica de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, donde dicha inferencia computacional de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se realiza mediante la técnica VIPER;
- 10 exponer dicha muestra a dicho compuesto;
- 15 medir cuantitativamente la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras en dicha muestra tratada con compuesto, donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se basa directa o indirectamente en la expresión de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, y donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras comprende inferir computacionalmente la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras a partir de perfiles de expresión génica de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras, donde dicha inferencia computacional de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se realiza mediante la técnica VIPER; y
- 20 evaluar cuantitativamente la inversión de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras en dicha muestra tratada con compuesto en comparación con una muestra de dicha enfermedad o trastorno sin tratamiento con dicho compuesto o un modelo expuesto a un vehículo usado para suministrar dicho compuesto.
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde un compuesto que induce la inversión global de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras indica que dicho compuesto trata dicha enfermedad o trastorno.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 2, donde dicho compuesto se selecciona de entre el grupo que consiste en compuestos químicos de molécula pequeña, péptidos, ácidos nucleicos, oligonucleótidos, anticuerpos, aptámeros, modificaciones de los mismos y combinaciones de los mismos.
- 35 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde dicha enfermedad o trastorno es un tumor.
- 40 5. El procedimiento de la reivindicación 4, donde dicho tumor se selecciona de entre el grupo que consiste en glioblastoma, meningioma, leucemia, linfoma, sarcoma, carcinoide, neuroendocrino, paraganglioma, melanoma, de próstata, páncreas, vejiga, estómago, colon, mama, cabeza y carcinoma de cuello, riñón, gástrico, del intestino delgado, ovario, hepatocelular, del cuerpo uterino y pulmón.
- 45 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicha medición cuantitativa de la actividad proteica de dicha pluralidad de proteínas reguladoras maestras se basa directa o indirectamente en el enriquecimiento de regulones de dichas proteínas reguladoras maestras.
- 50 7. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dichos perfiles de expresión génica se obtienen a partir de modelos in vivo.
- 55 8. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dichos perfiles de expresión génica se obtienen a partir de modelos in vitro.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dichos regulones se infieren mediante ARACNe.

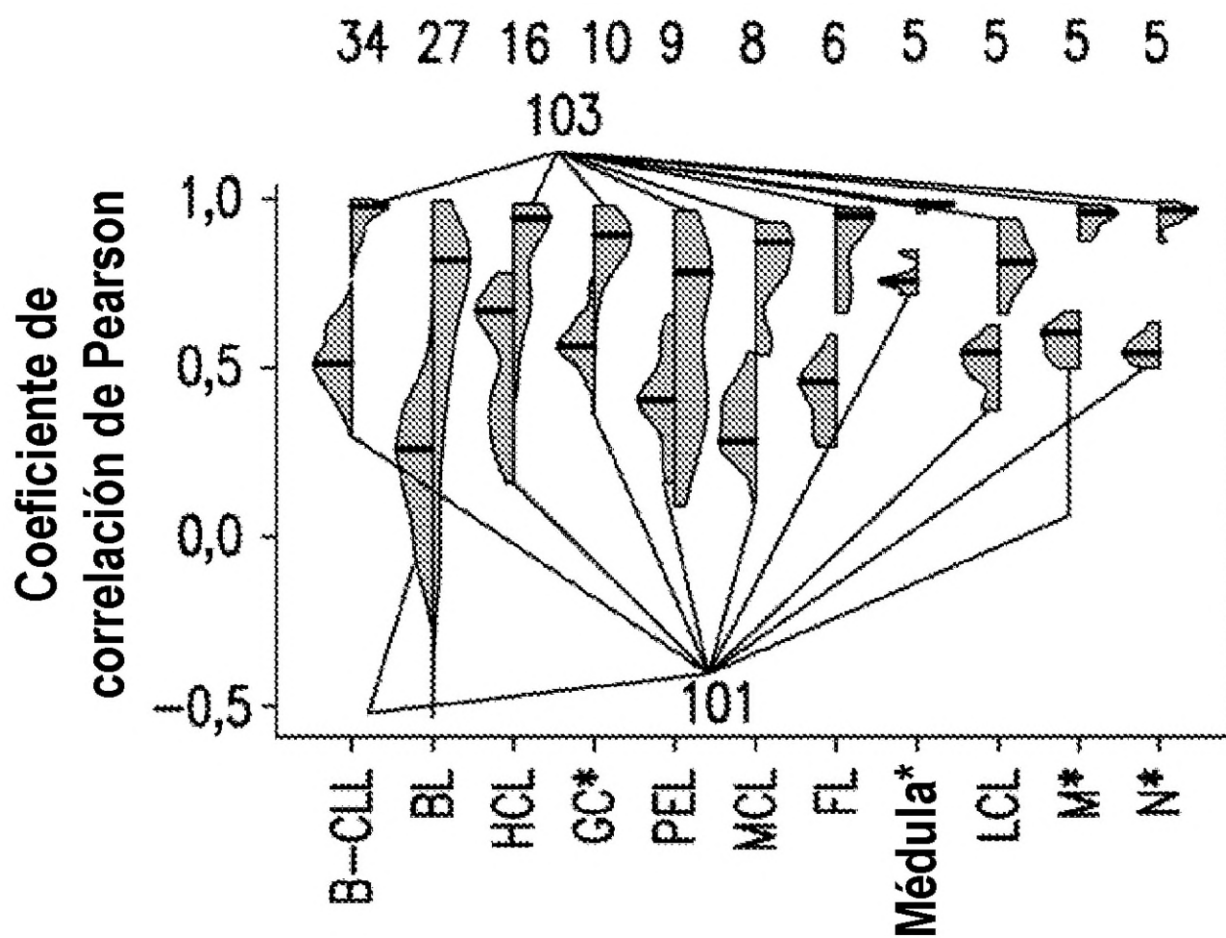


FIG. 1A

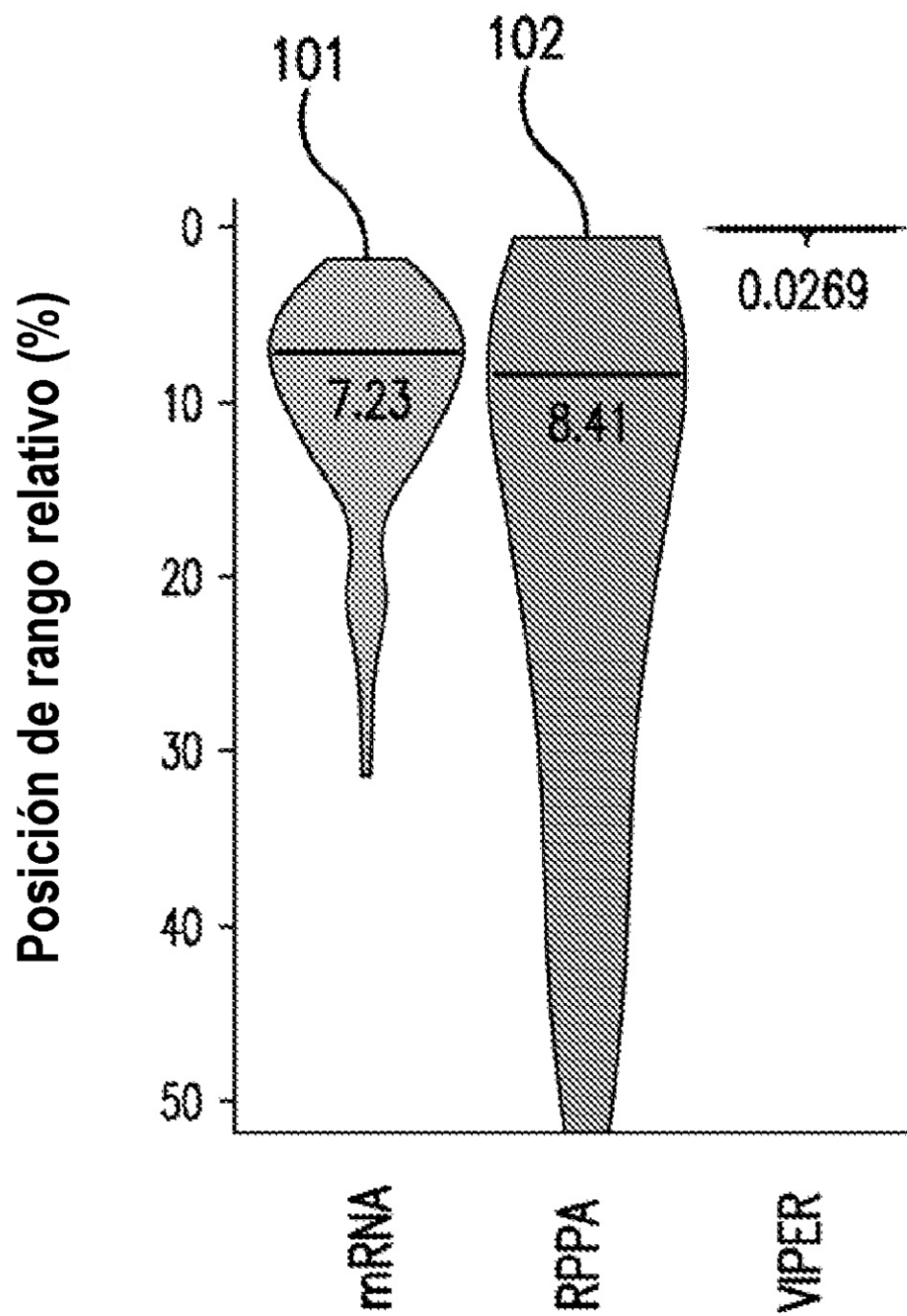


FIG. 1B

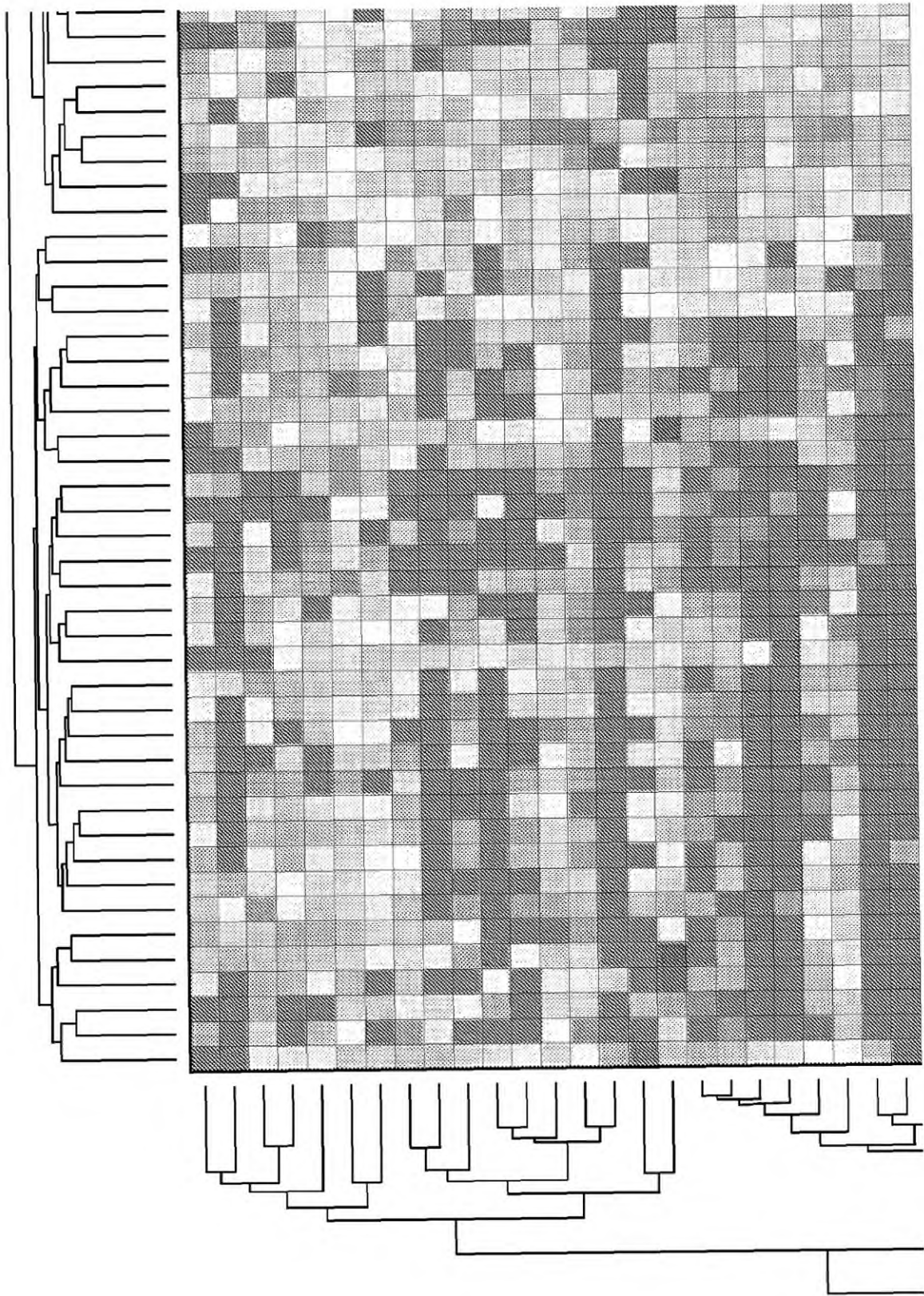


FIG. 2A

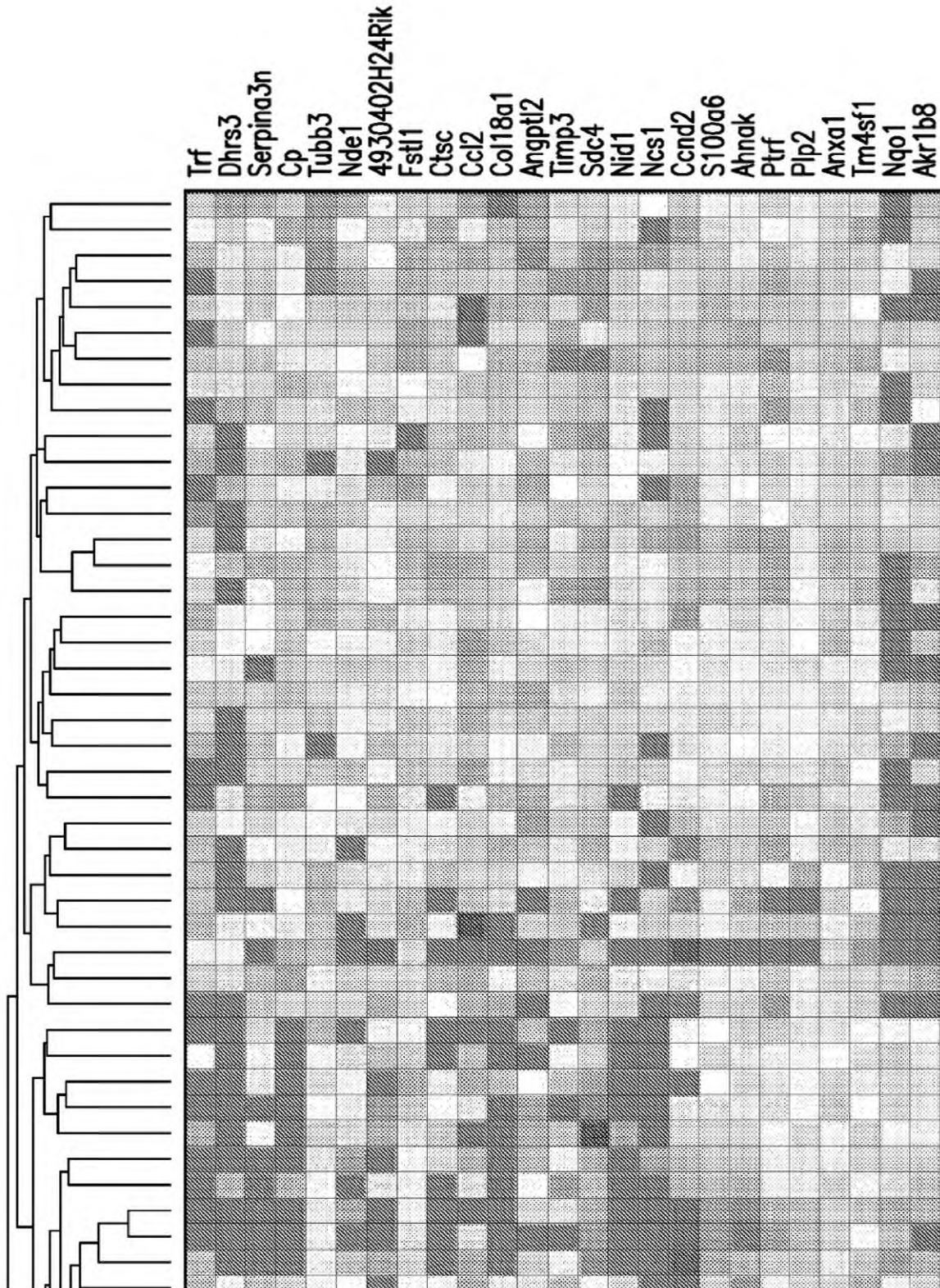


FIG. 2A (Continuación)

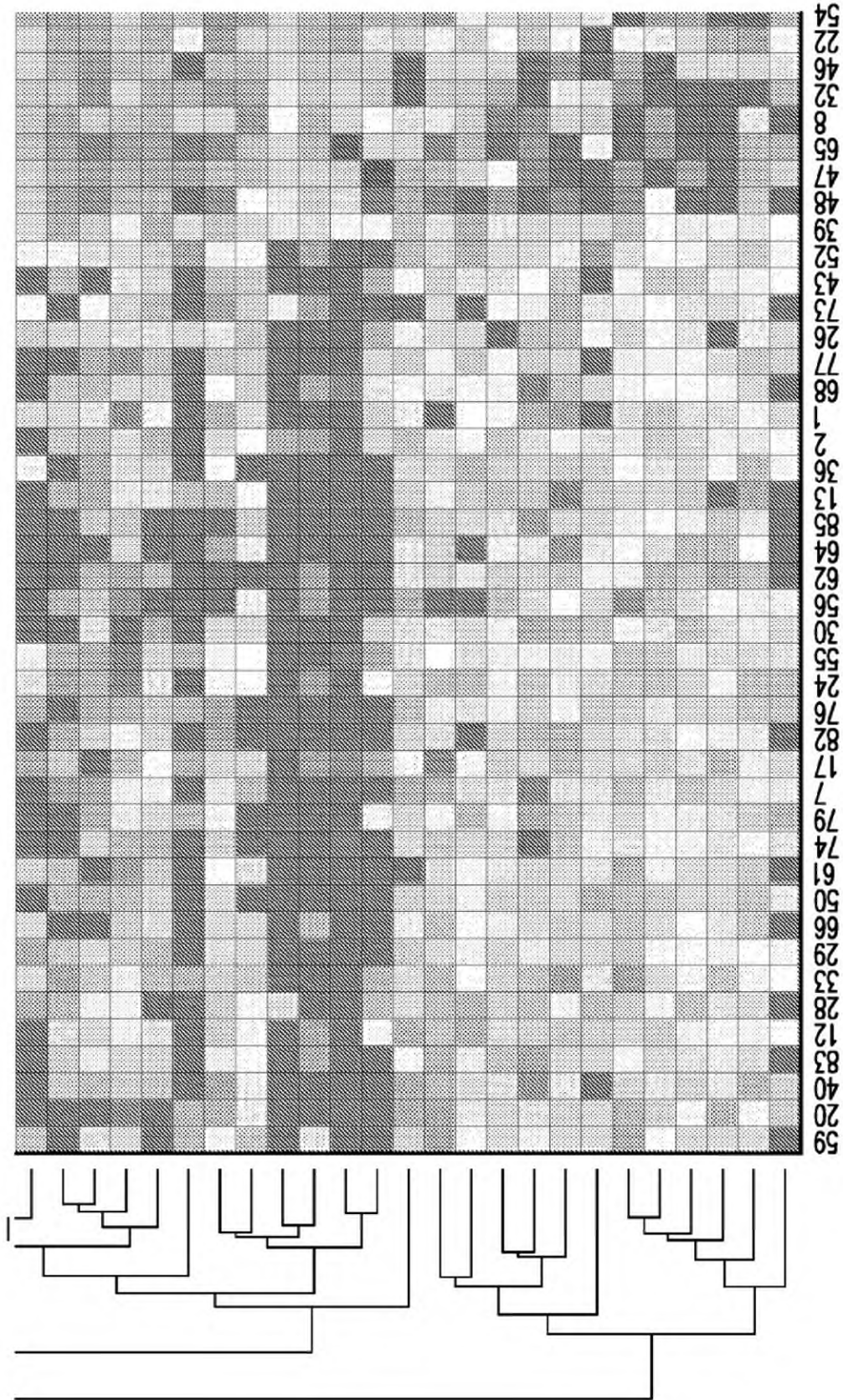


FIG. 2A (Continuación)

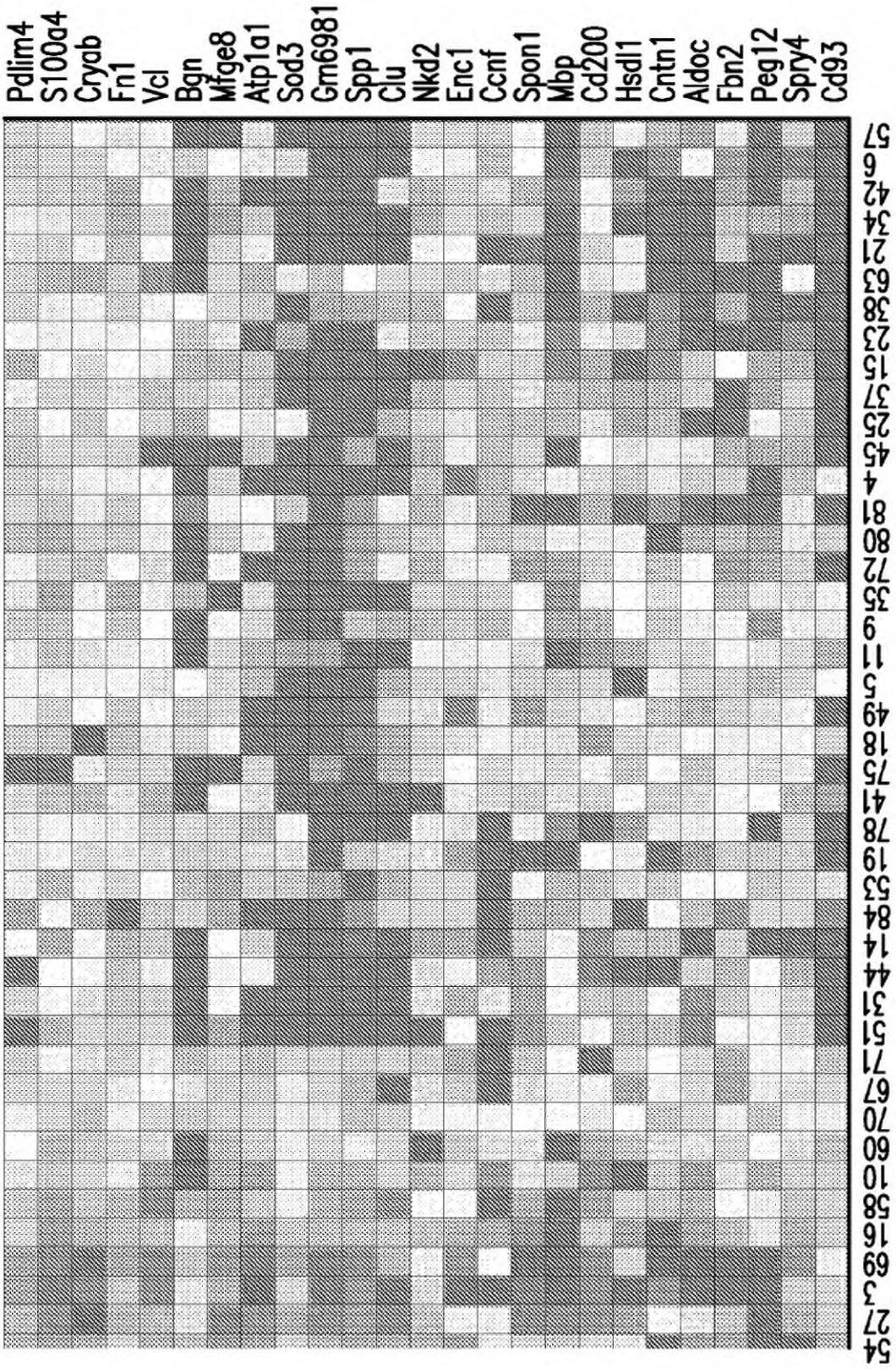


FIG. 2A (Continuación)

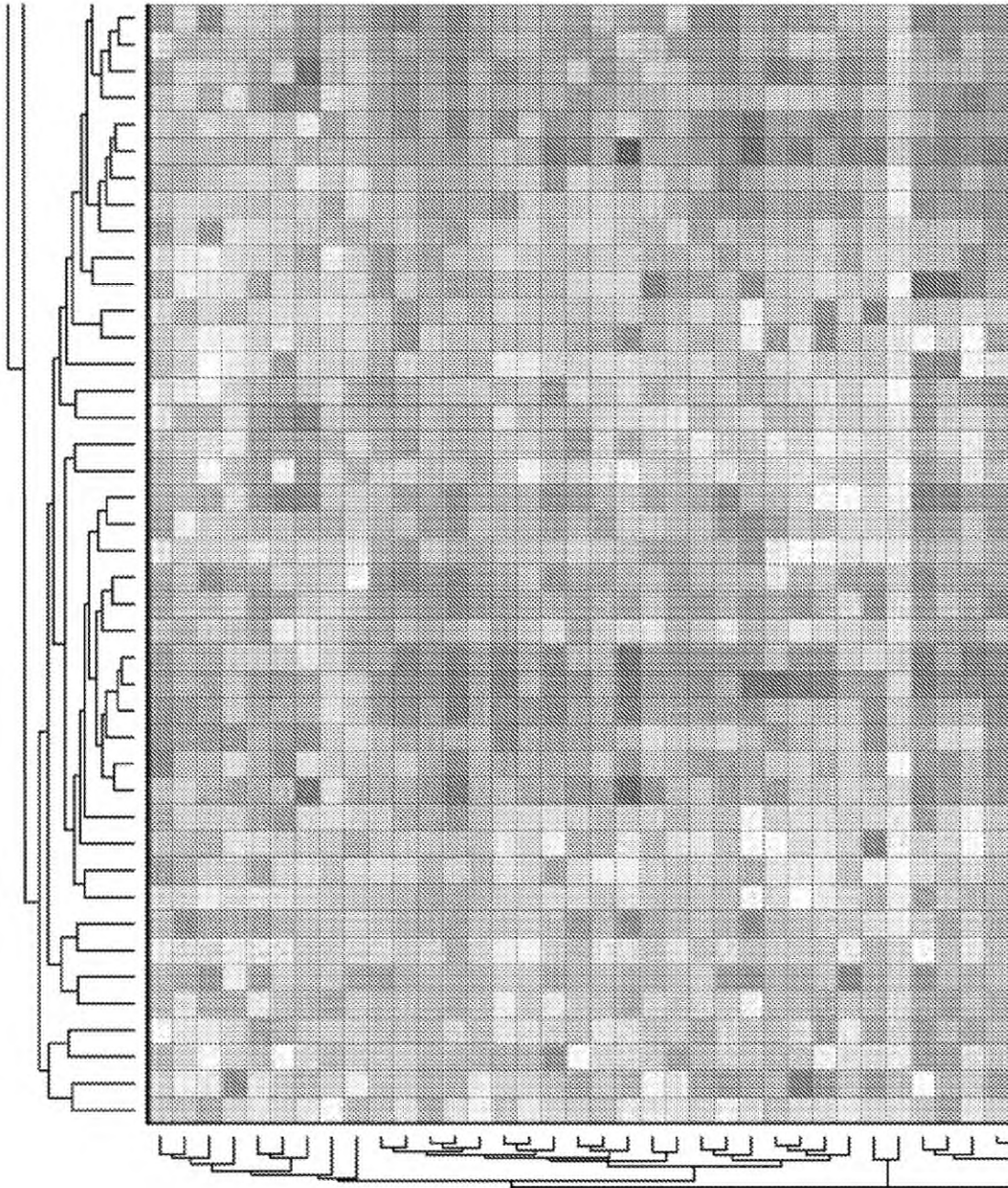


FIG. 2B

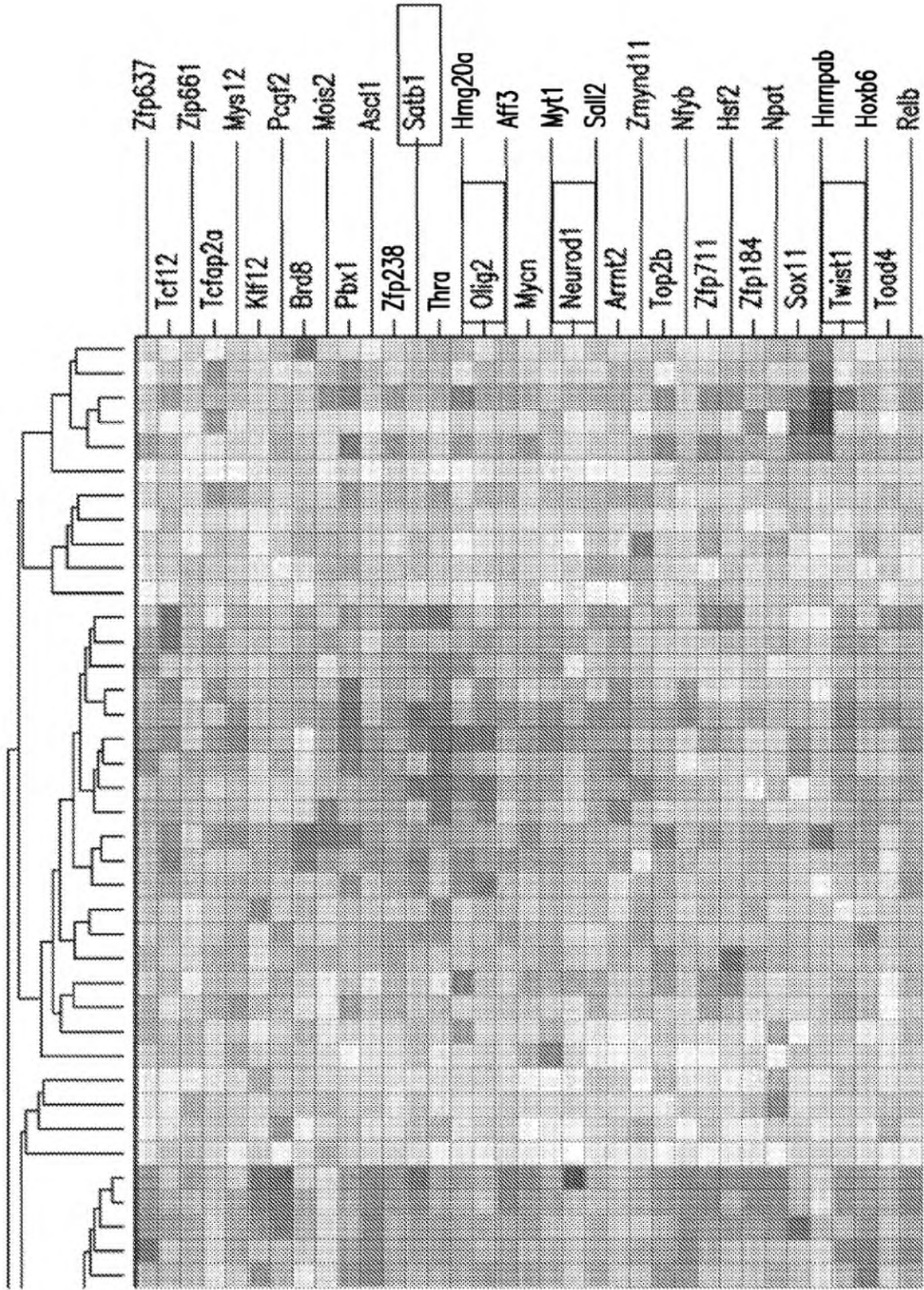
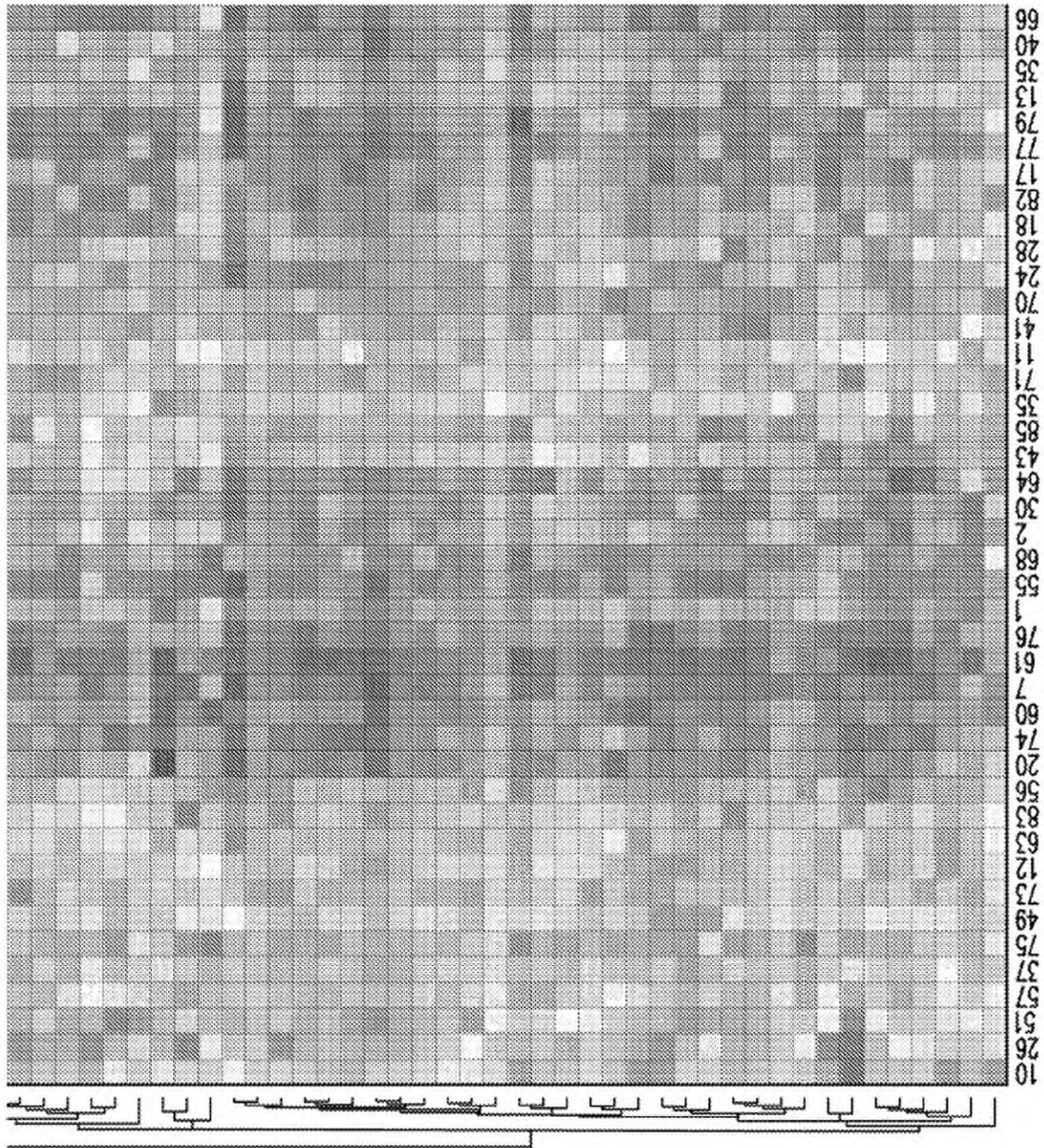


FIG. 2B (Continuación)



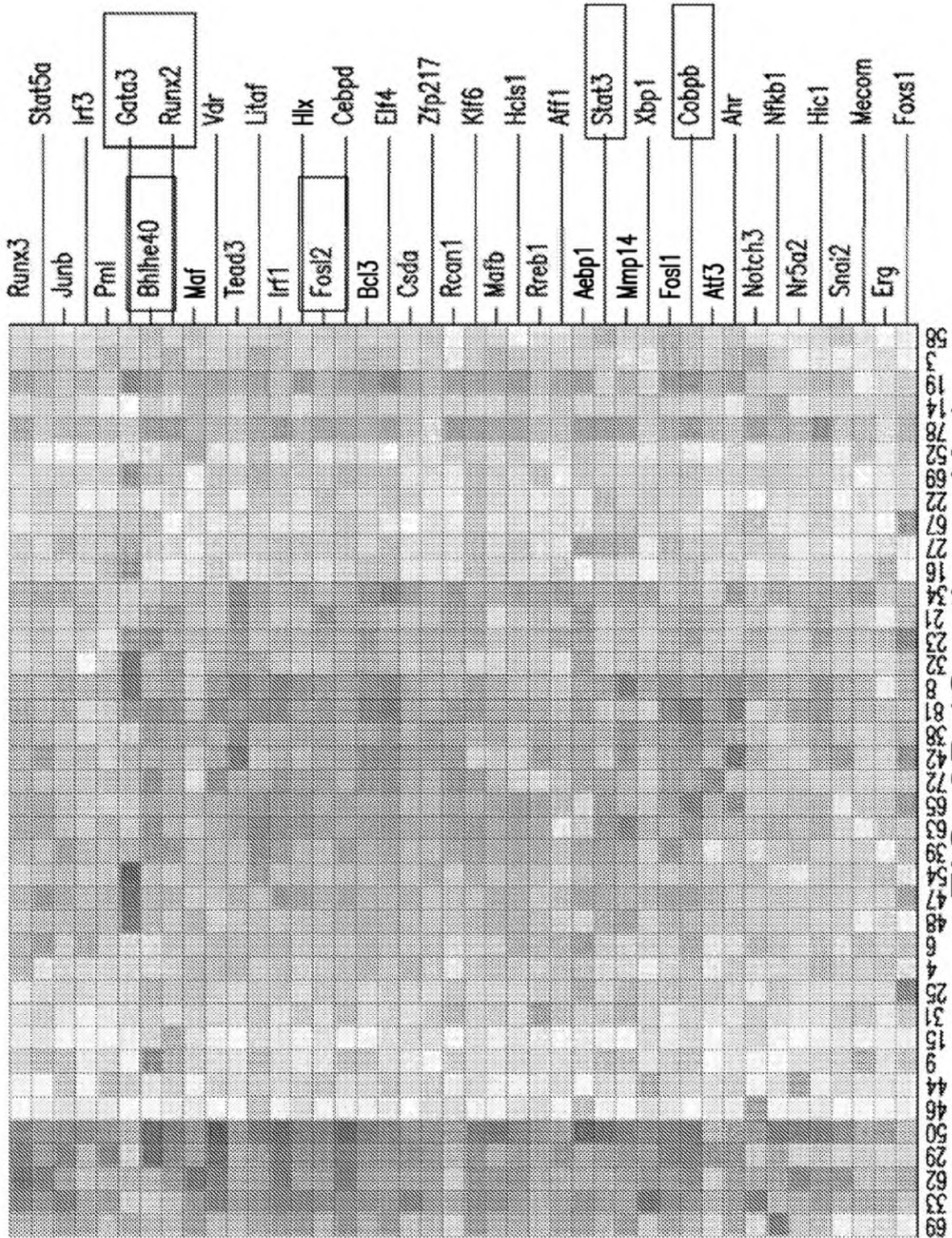


FIG. 2B (Continuación)

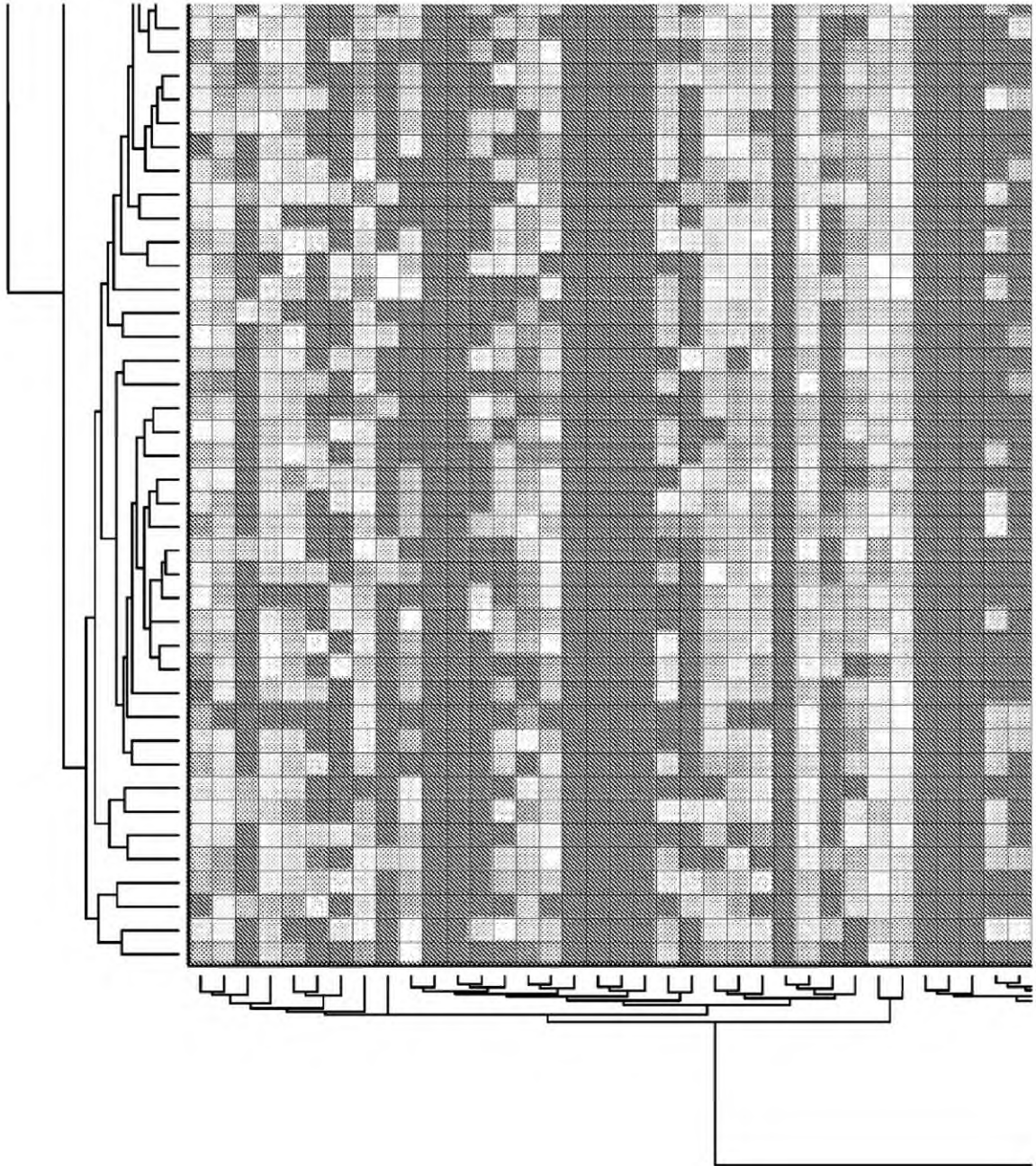


FIG. 2C

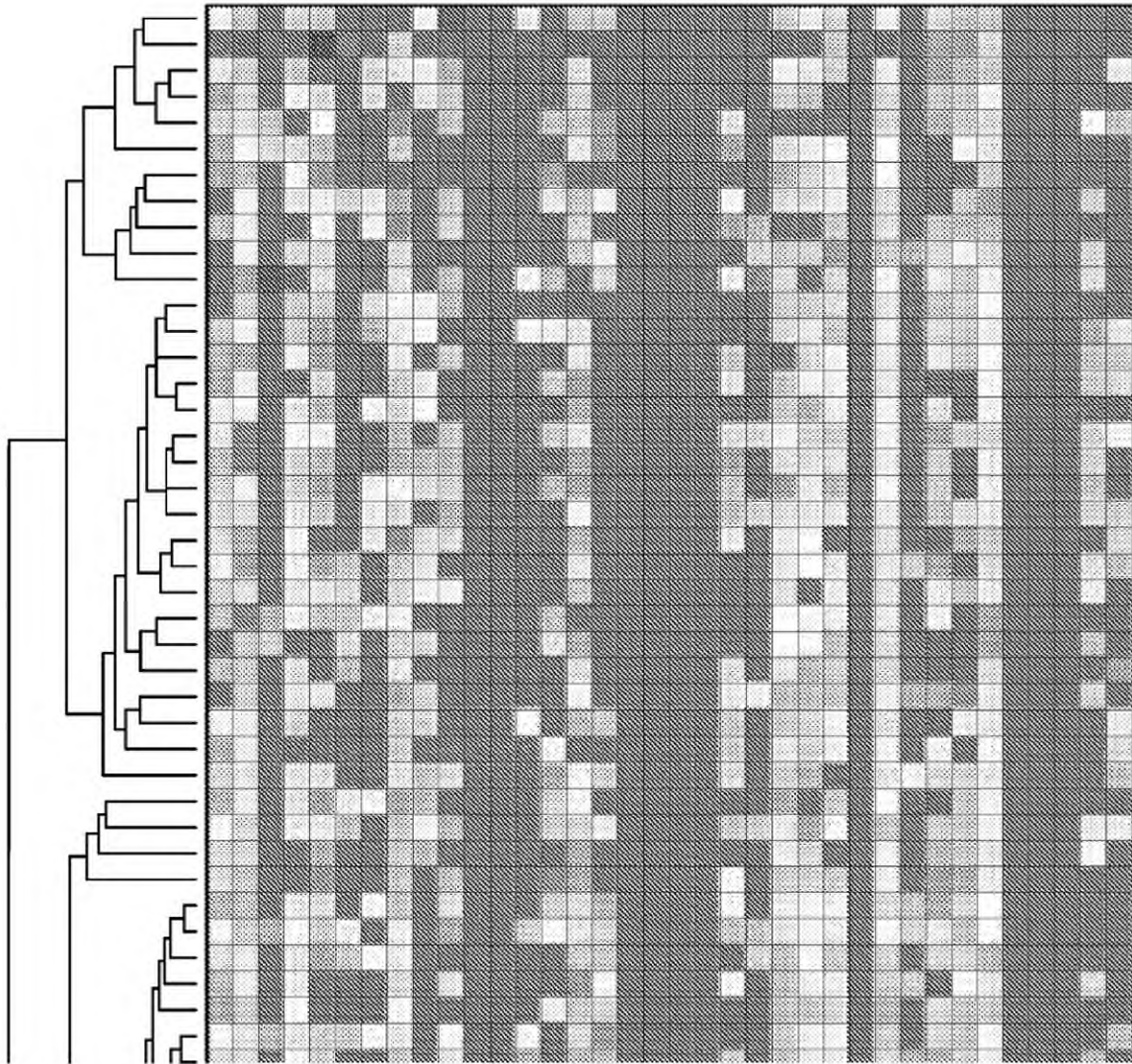


FIG. 2C (Continuación)

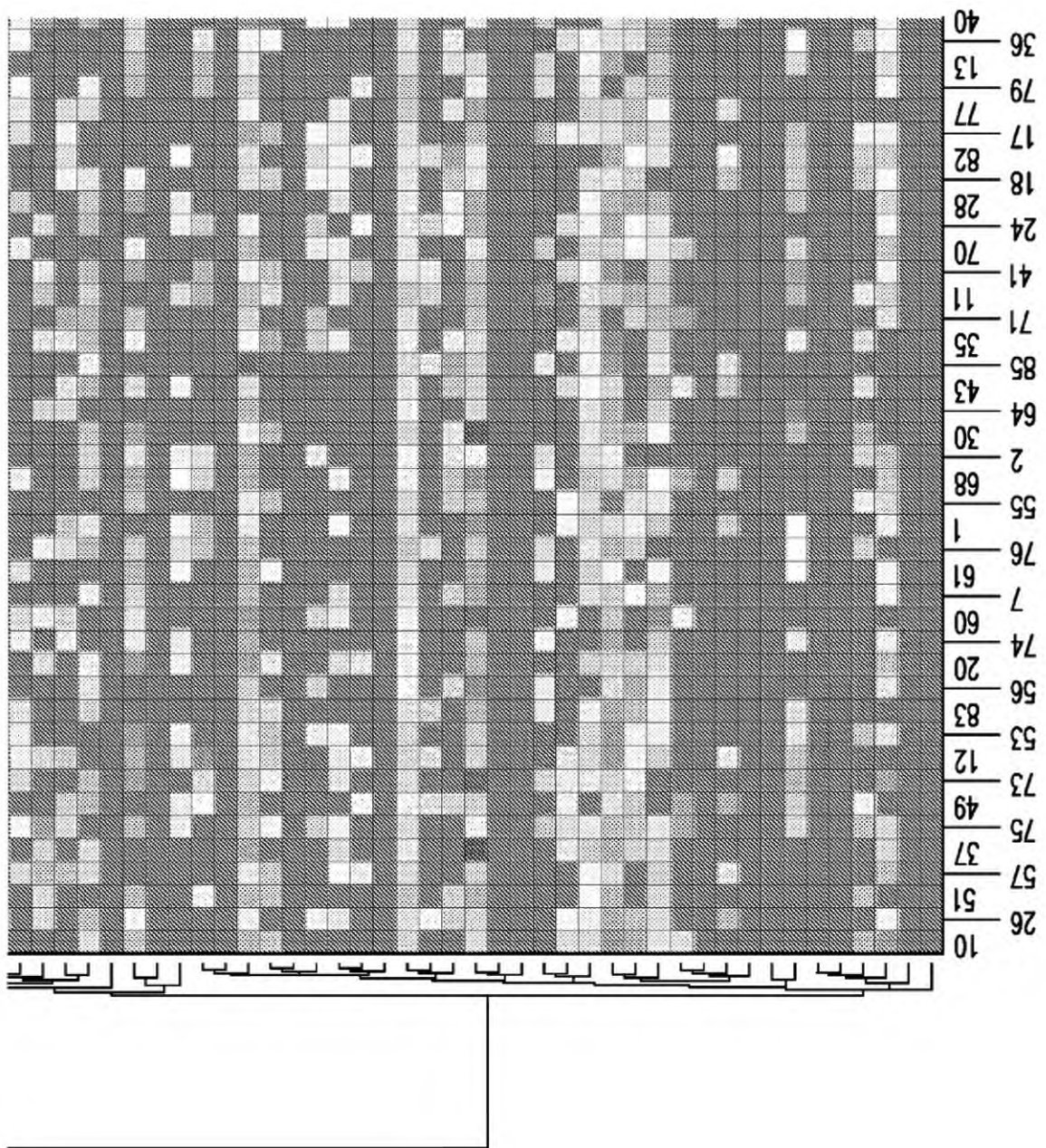


FIG. 2C (Continuación)

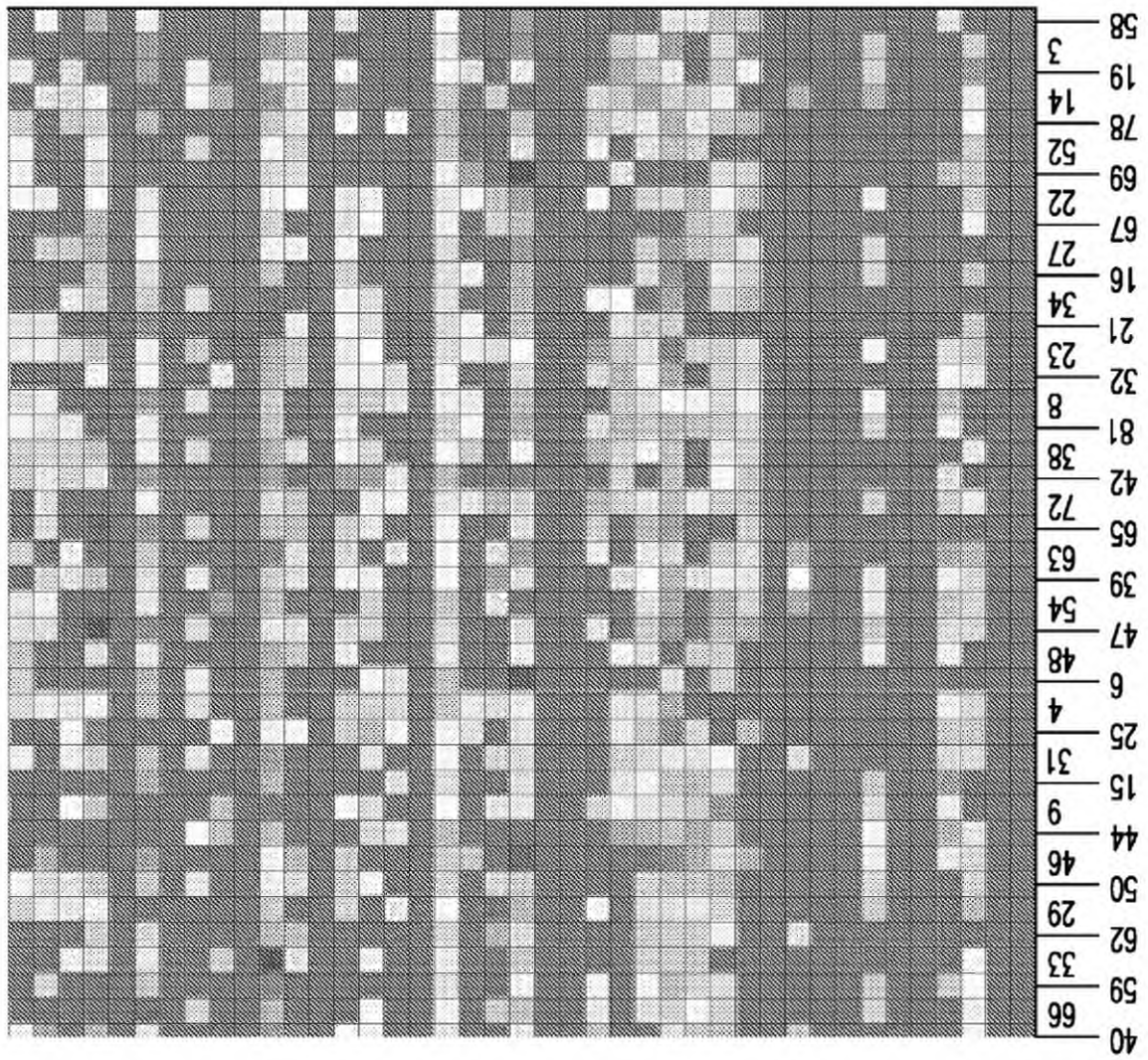


FIG. 2C (Continuación)

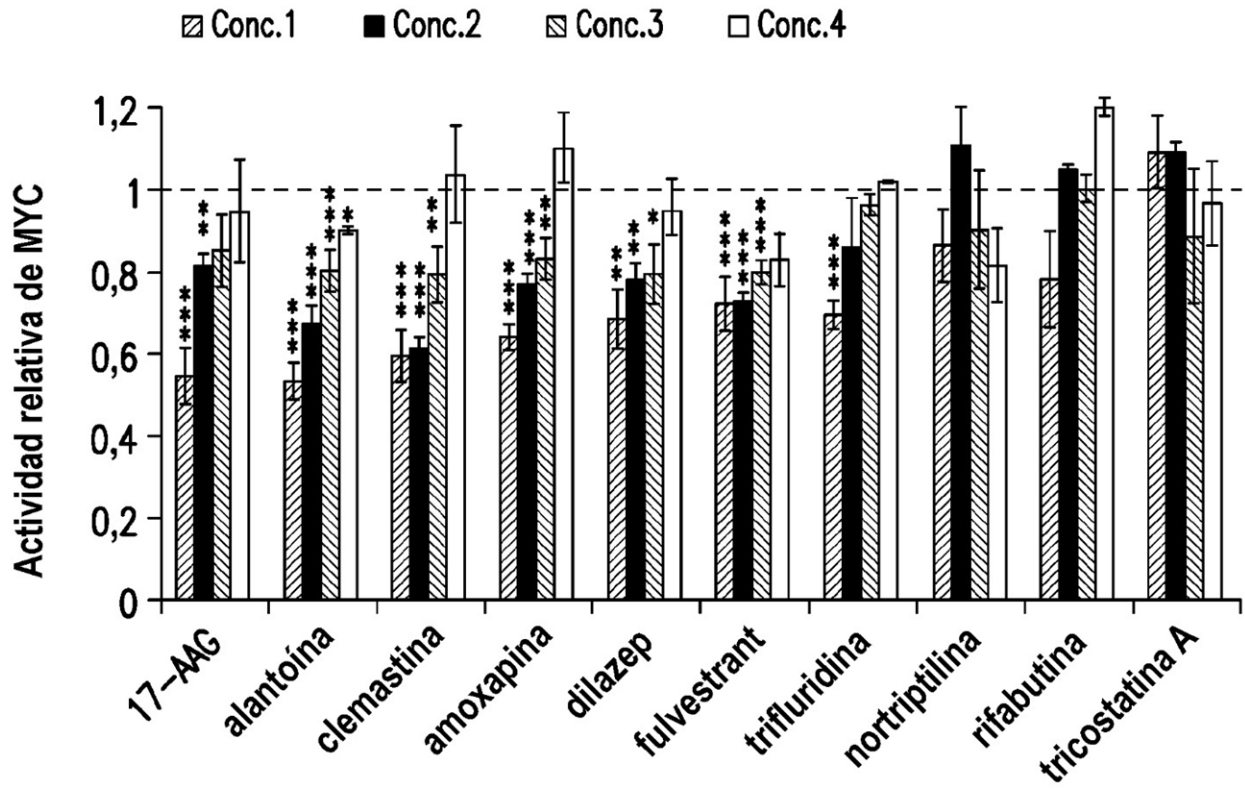


FIG. 3

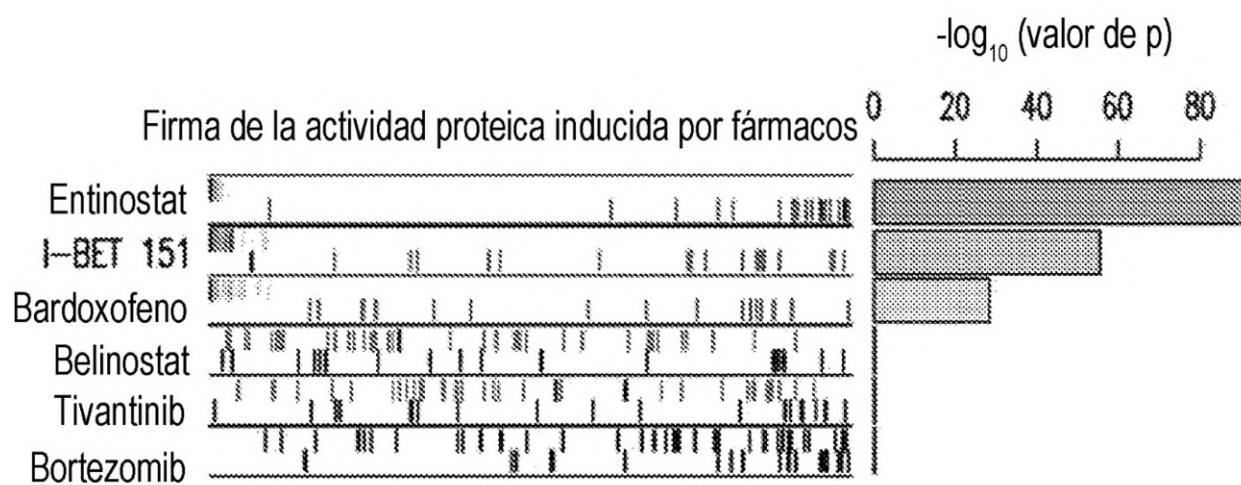


FIG. 4A

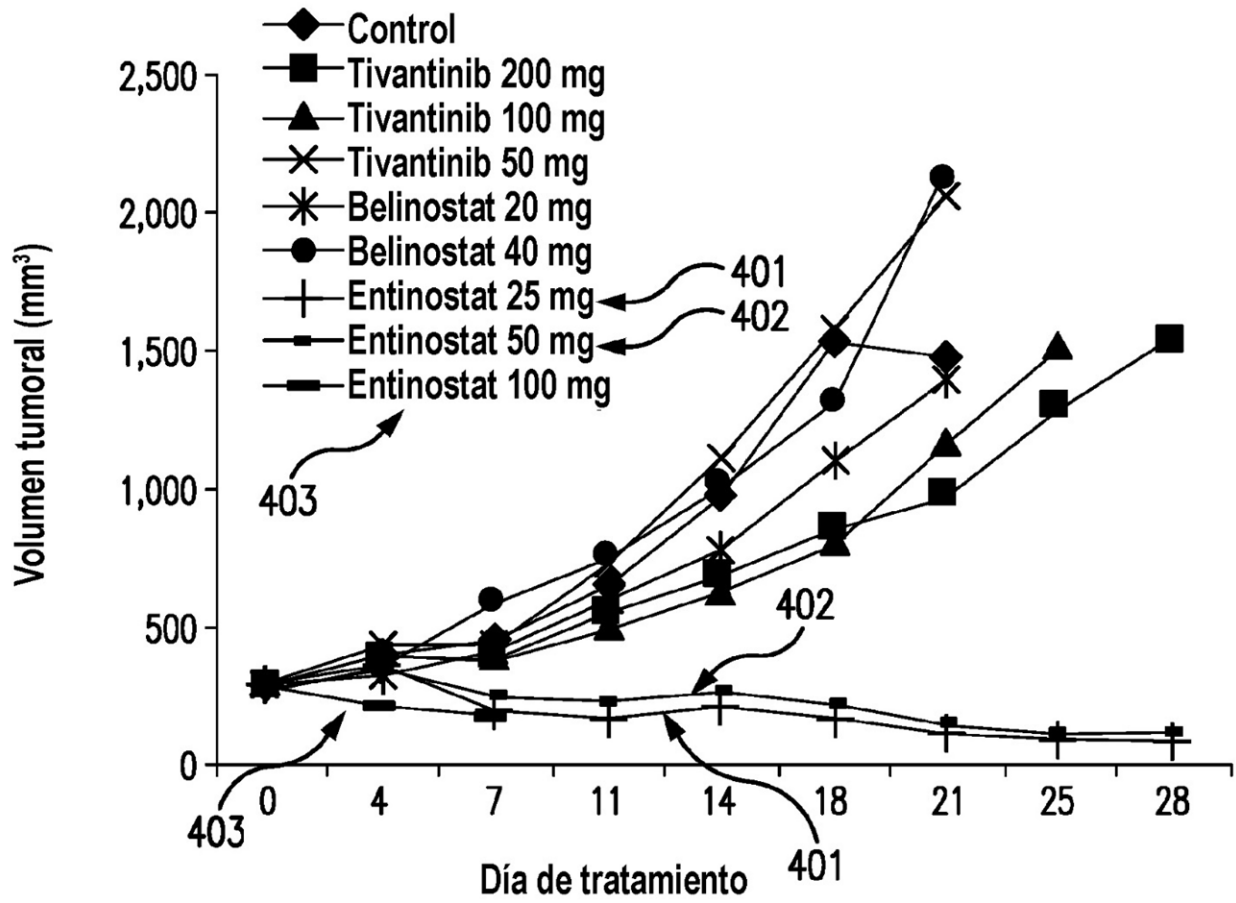


FIG. 4B

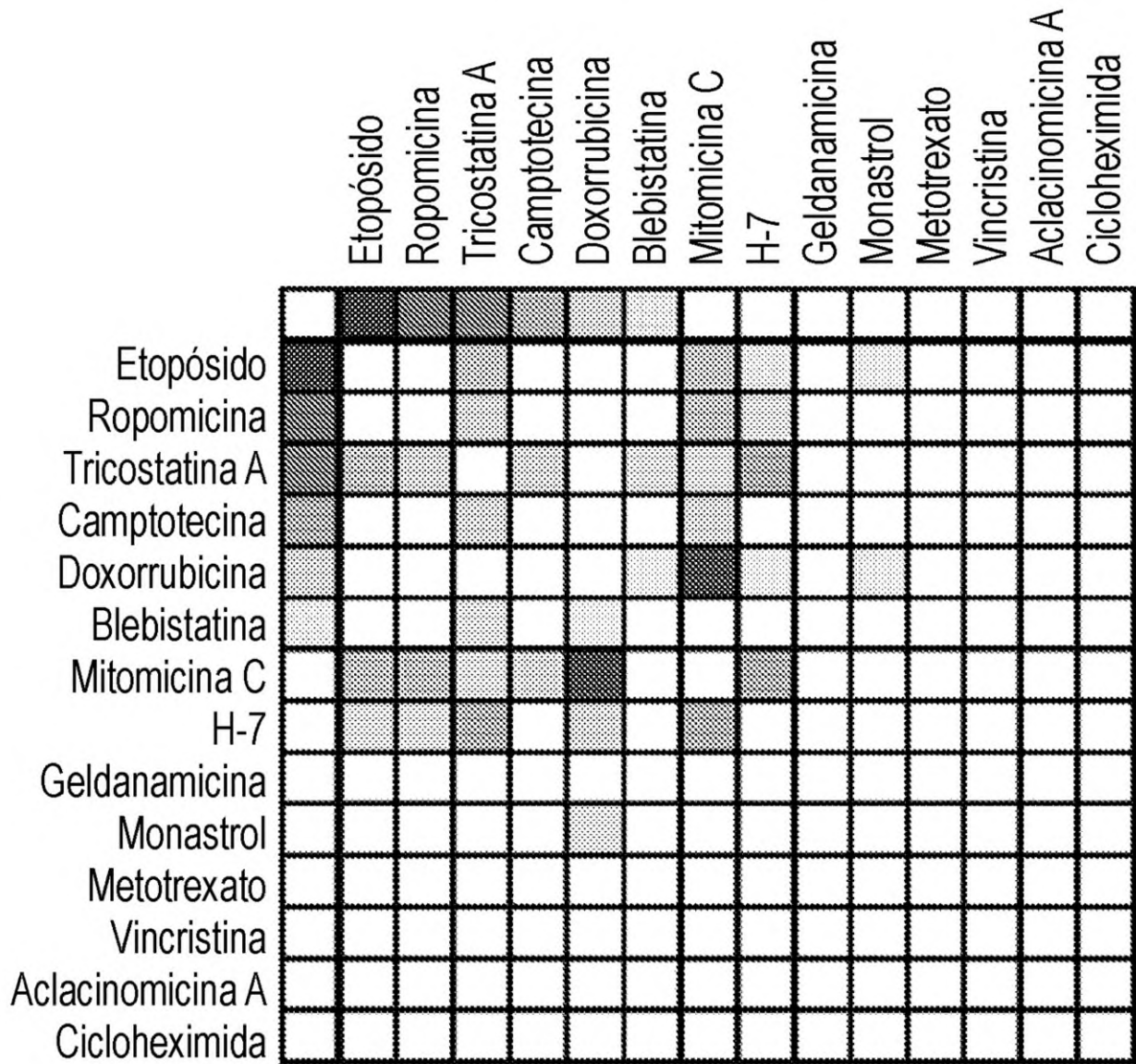


FIG. 5A

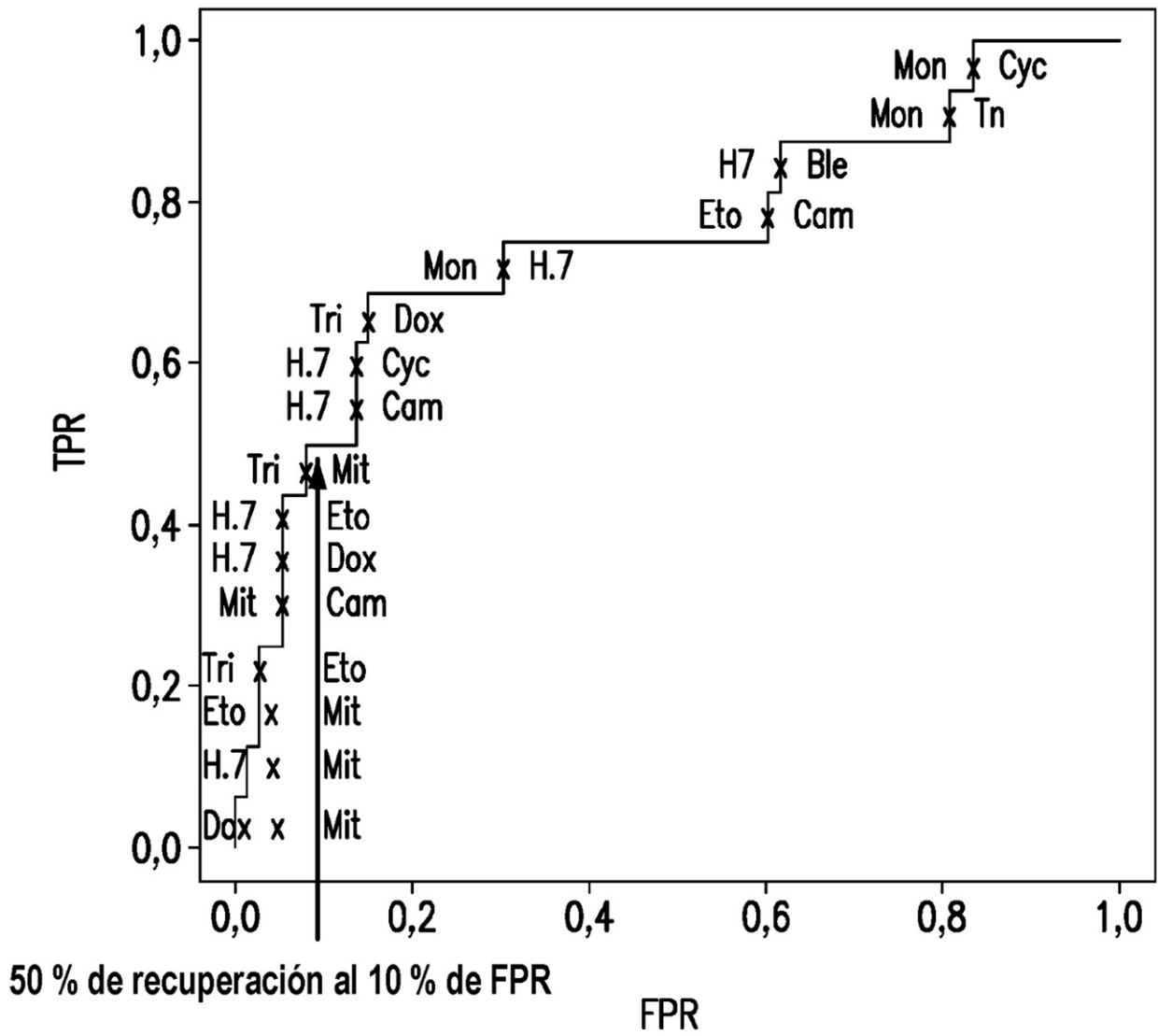


FIG. 5B

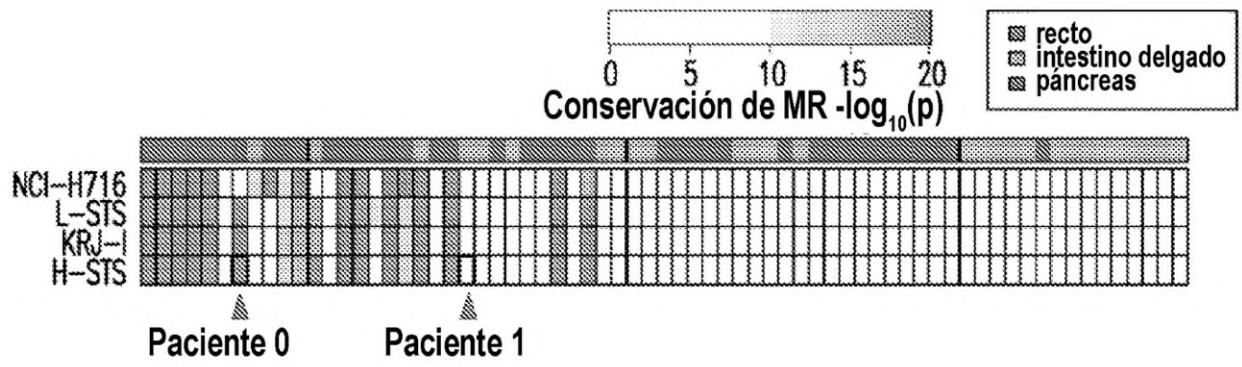


FIG. 6A

MR del paciente 0

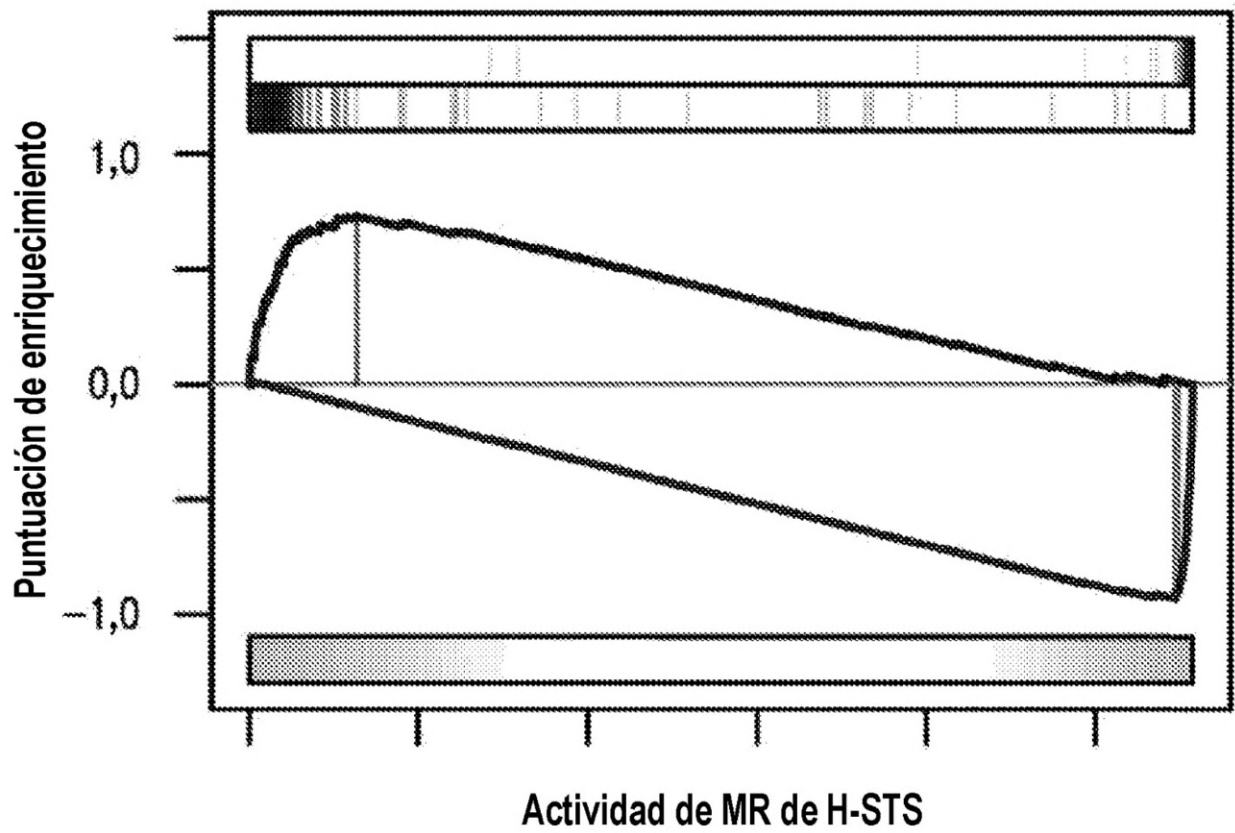


FIG. 6B

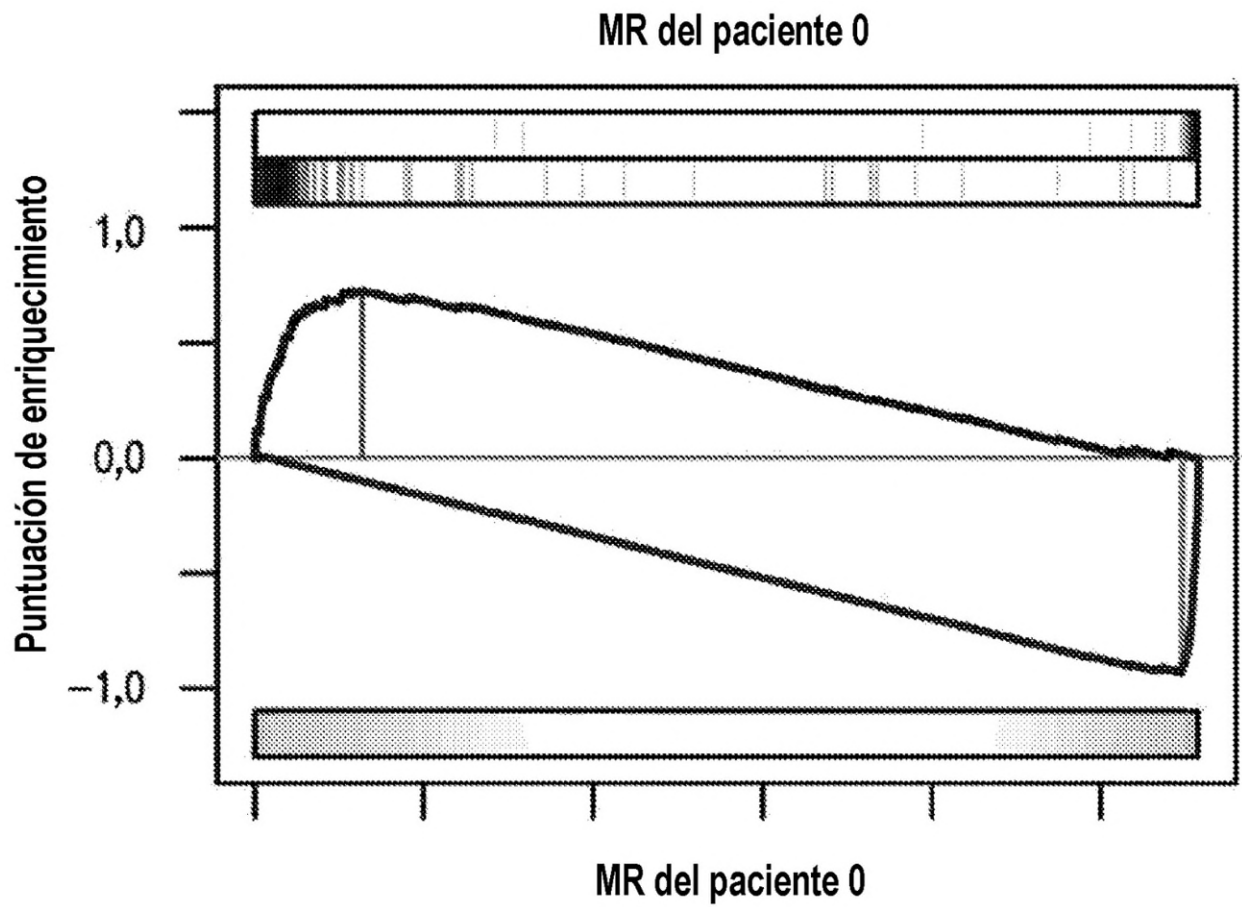


FIG. 6C

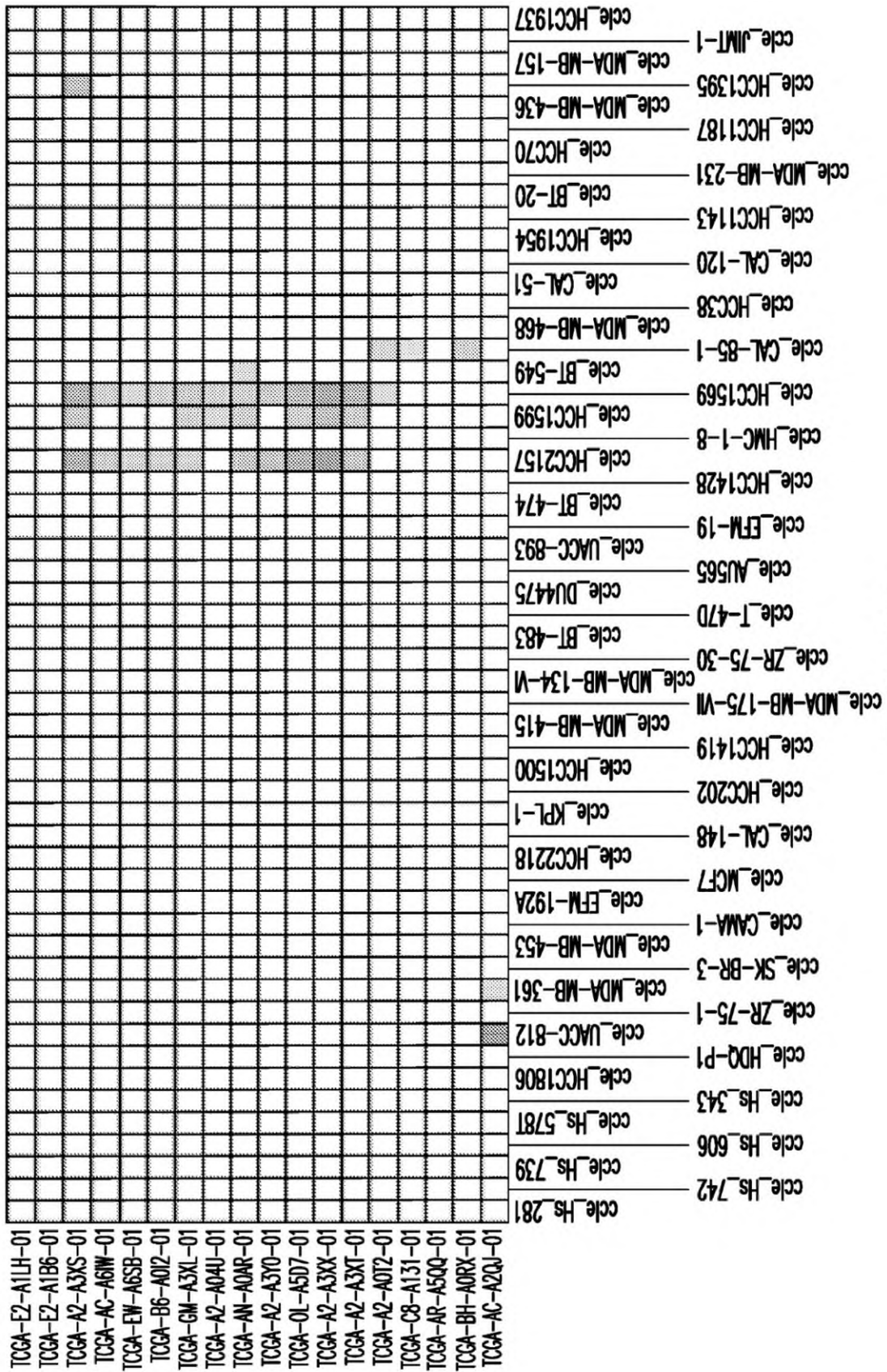


FIG. 6D

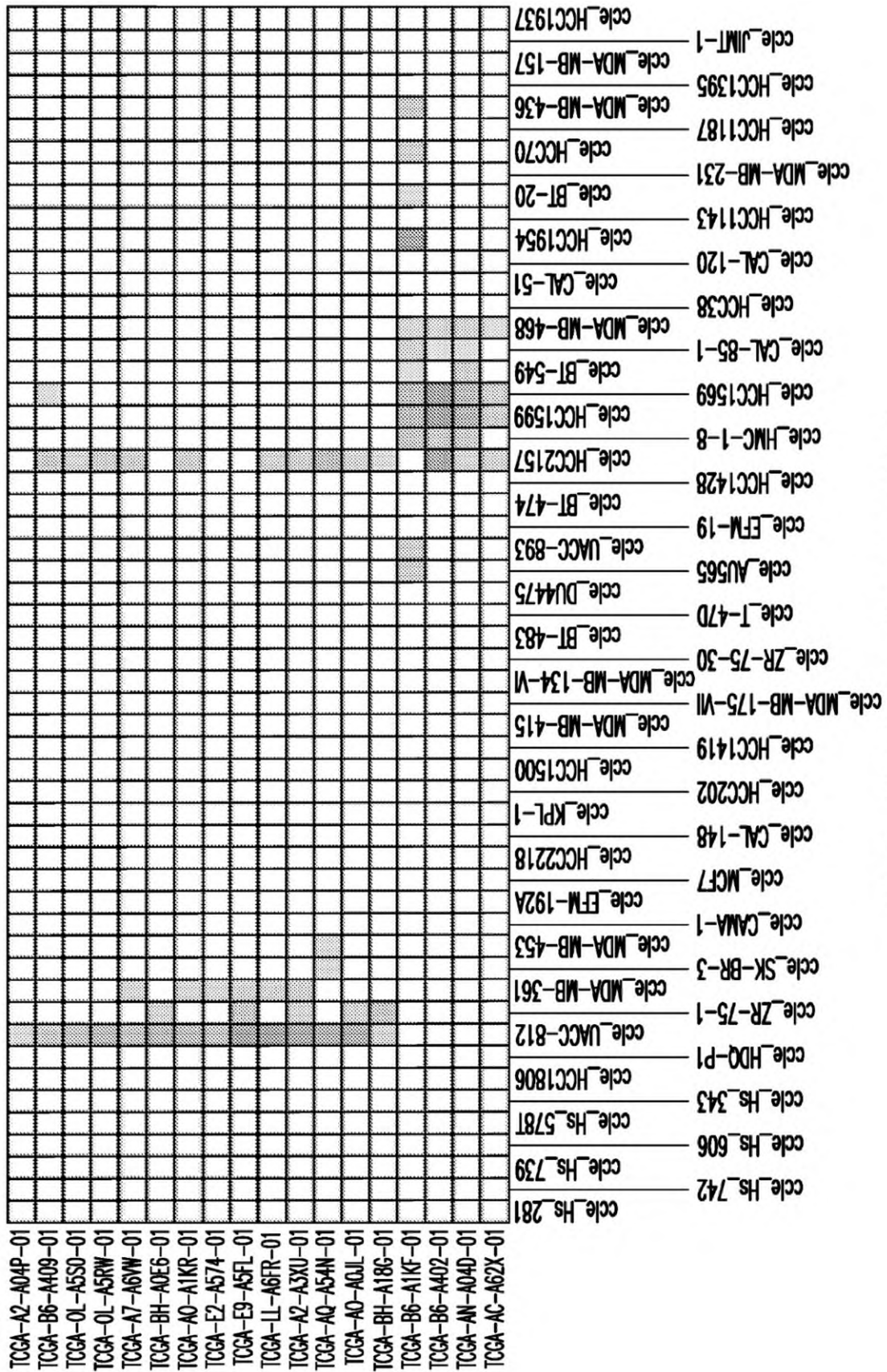


FIG. 6D (Continuación)

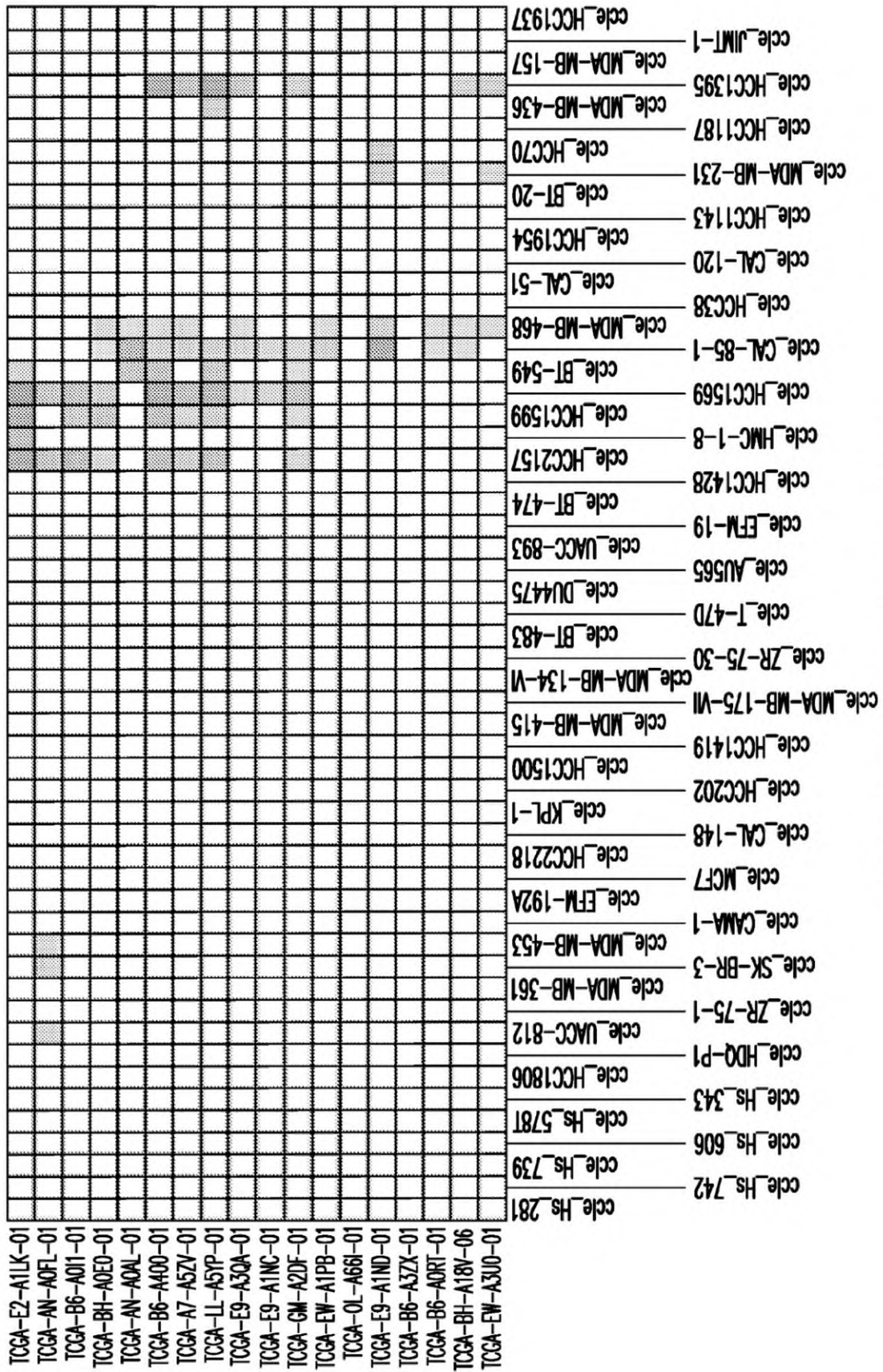


FIG. 6D (Continuación)

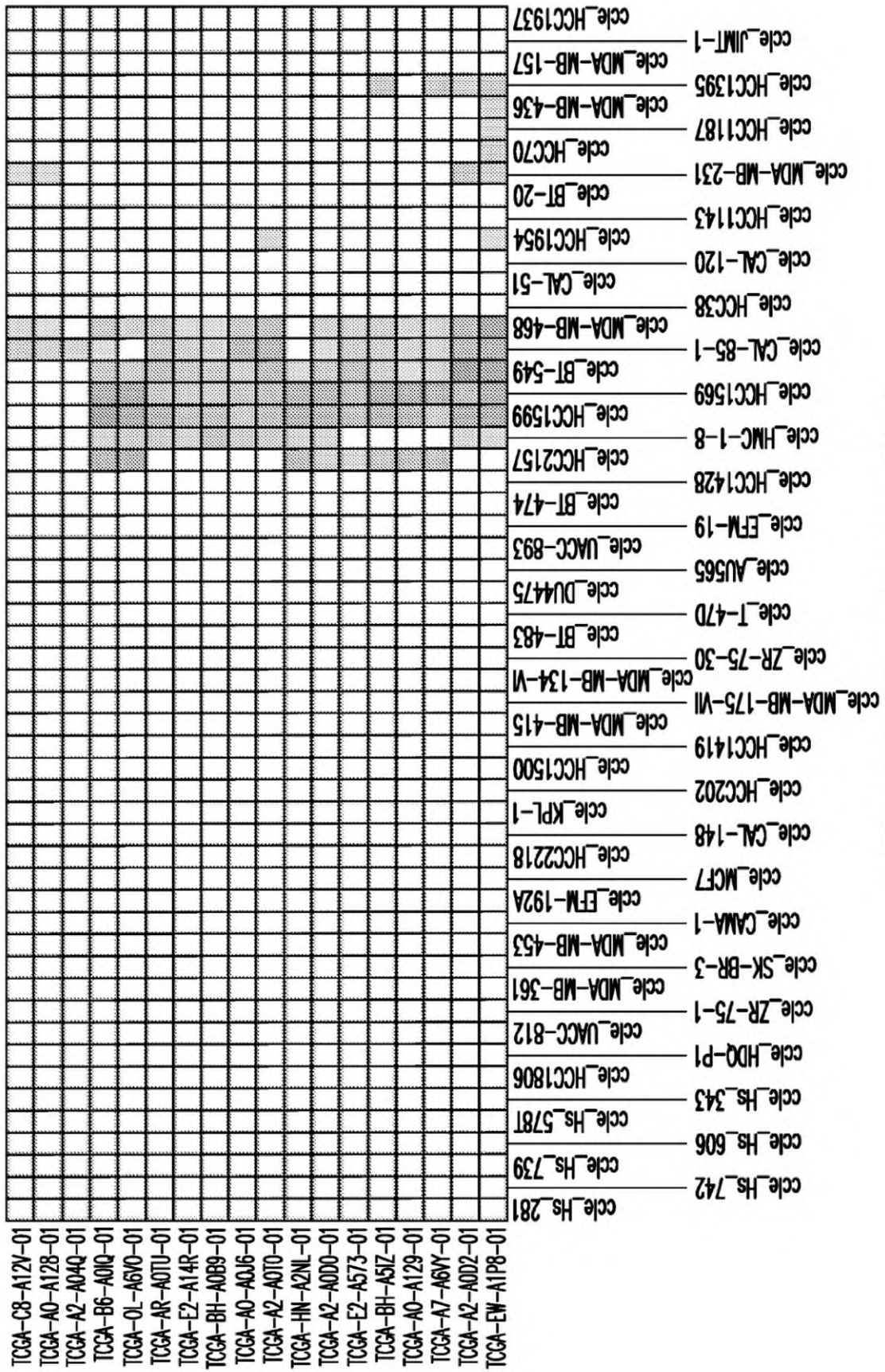


FIG. 6D (Continuación)

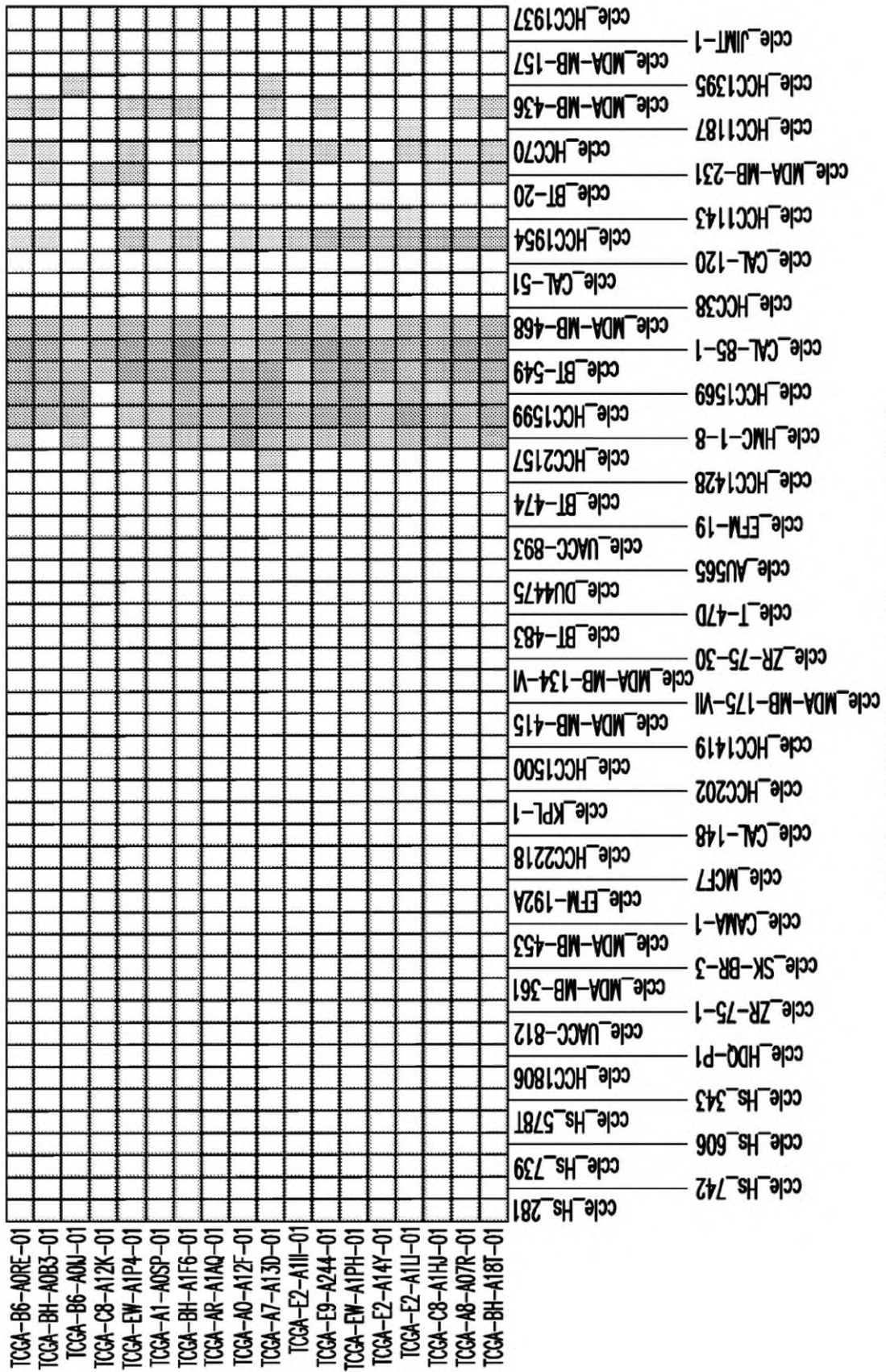


FIG. 6D (Continuación)

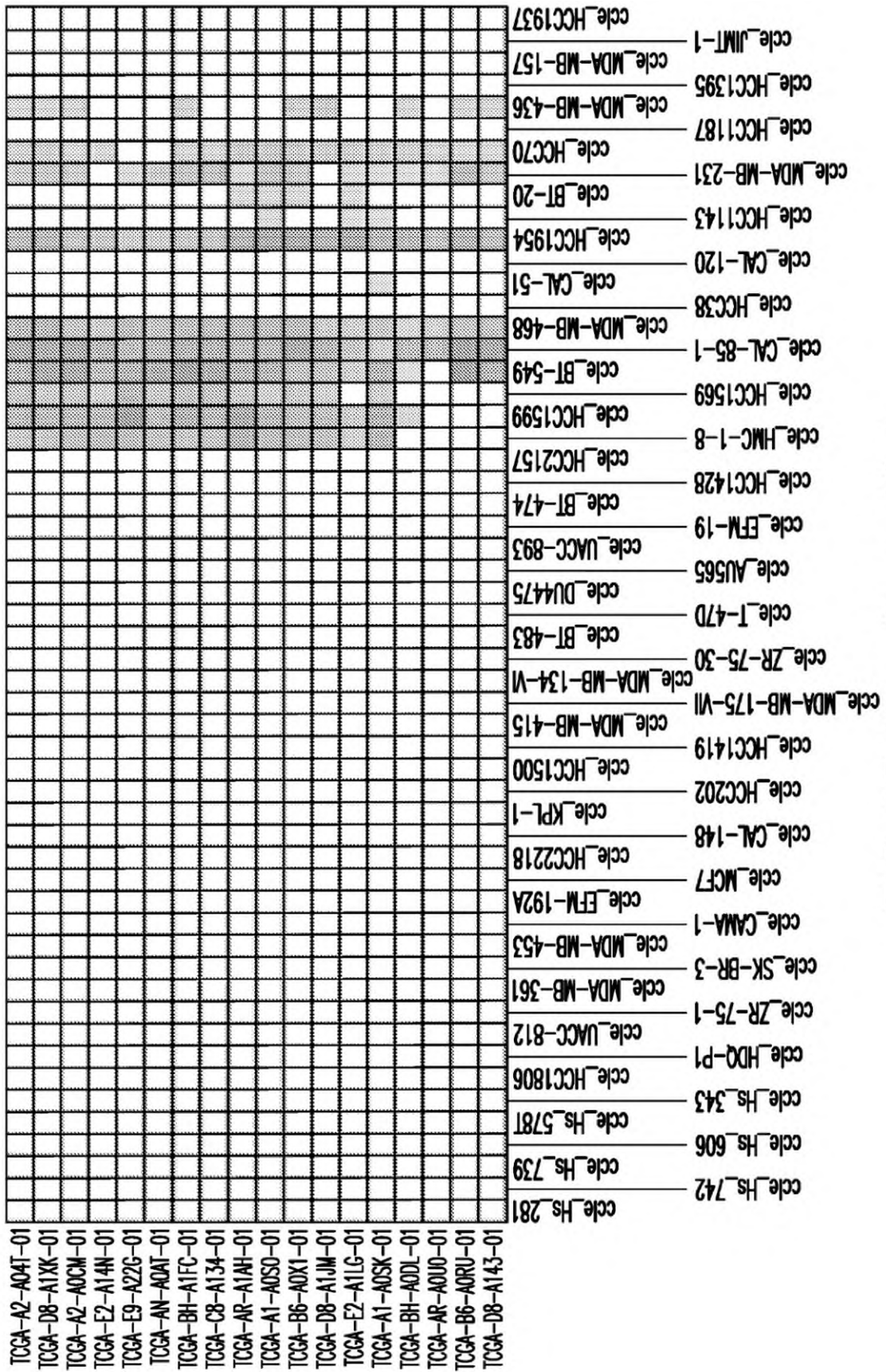


FIG. 6D (Continuación)

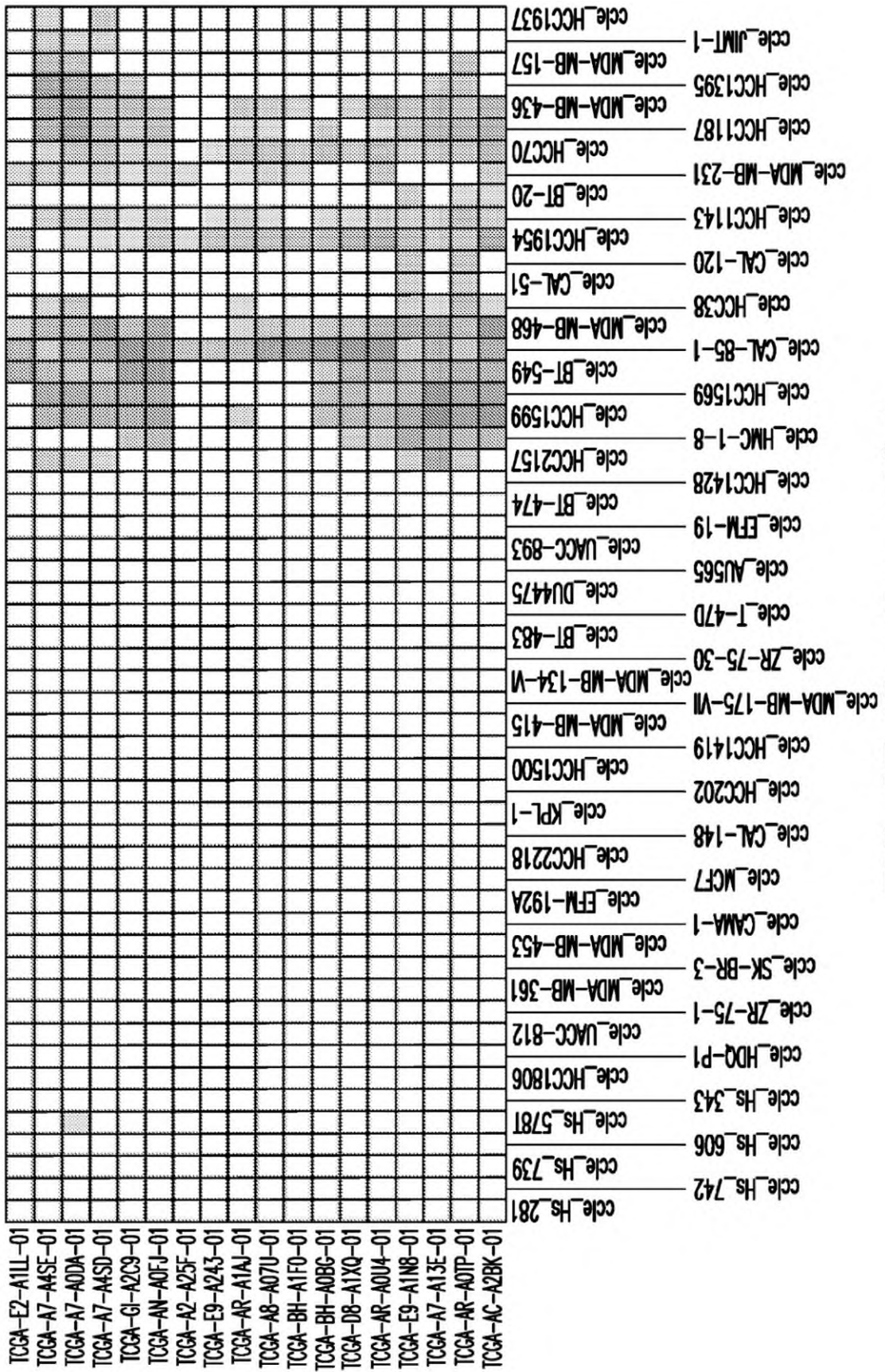


FIG. 6D (Continuación)

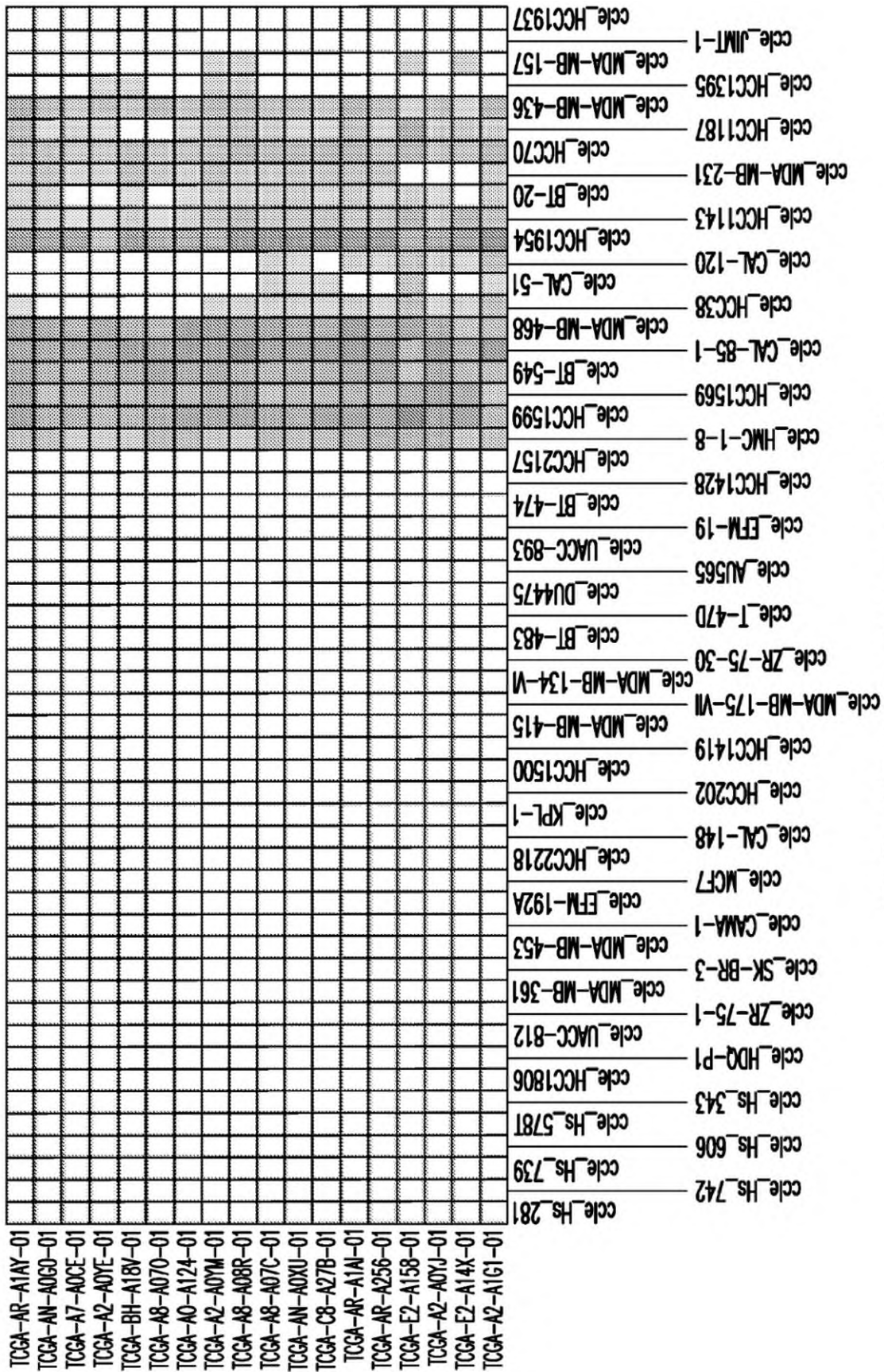


FIG. 6D (Continuación)

TCGA-AR-A240-01	ccl_Hs_281
TCGA-BH-A0WA-01	ccl_Hs_739
TCGA-AR-A2LR-01	ccl_Hs_606
TCGA-AR-A251-01	ccl_Hs_343
TCGA-A7-A261-01	ccl_HCC1806
TCGA-E2-A1AZ-01	ccl_HDD-P1
TCGA-D8-A1JL-01	ccl_ZR-75-1
TCGA-D8-A147-01	ccl_MDA-MB-361
TCGA-AR-A1AR-01	ccl_SK-BR-3
TCGA-B6-A016-01	ccl_CAMA-1
TCGA-EW-A10W-01	ccl_MDA-MB-453
TCGA-D8-A27F-01	ccl_EFM-192A
TCGA-A0-A014-01	ccl_MCF7
TCGA-A2-A0SX-01	ccl_HCC2218
TCGA-E2-A150-01	ccl_CAL-148
TCGA-A0-A04J-01	ccl_KPL-1
TCGA-A7-A26F-01	ccl_HCC1500
TCGA-BH-A0BW-01	ccl_MDA-MB-415
	ccl_MDA-MB-175-VII
	ccl_ZR-75-30
	ccl_BT-483
	ccl_T-47D
	ccl_DU4475
	ccl_AU565
	ccl_UACC-893
	ccl_EFM-19
	ccl_HCC1428
	ccl_HMC-1-8
	ccl_HCC1599
	ccl_HCC1569
	ccl_BT-549
	ccl_CAL-85-1
	ccl_MDA-MB-468
	ccl_HCC38
	ccl_CAL-120
	ccl_HCC1954
	ccl_HCC1143
	ccl_MDA-MB-231
	ccl_HCC70
	ccl_HCC1187
	ccl_MDA-MB-436
	ccl_HCC1395
	ccl_MDA-MB-157
	ccl_JMT-1
	ccl_HCC1937

FIG. 6D (Continuación)

TCGA-D8-A27M-01	ccl_Hs_281
TCGA-A7-A26G-01	ccl_Hs_739
TCGA-BH-A18Q-01	ccl_Hs_606
TCGA-AR-A0TS-01	ccl_Hs_343
TCGA-A2-A3XY-01	ccl_HCC1806
TCGA-A7-A6W-01	ccl_HDQ-P1
TCGA-AC-A2QH-01	ccl_ZR-75-1
TCGA-BH-A0BL-01	ccl_MDA-MB-361
TCGA-BH-A0AV-01	ccl_SK-BR-3
TCGA-D8-A27H-01	ccl_MDA-MB-453
TCGA-D8-A142-01	ccl_CAMA-1
	ccl_EFM-192A
	ccl_MCF7
	ccl_HCC2218
	ccl_CAL-148
	ccl_HCC202
	ccl_HCC1419
	ccl_MDA-MB-175-VI
	ccl_MDA-MB-134-VI
	ccl_ZR-75-30
	ccl_BT-483
	ccl_T-47D
	ccl_AU565
	ccl_UACC-893
	ccl_EFM-19
	ccl_HCC1428
	ccl_HMC-1-8
	ccl_HCC1569
	ccl_BT-549
	ccl_MDA-MB-468
	ccl_HCC38
	ccl_CAL-120
	ccl_HCC1954
	ccl_HCC1143
	ccl_BT-20
	ccl_MDA-MB-231
	ccl_HCC1187
	ccl_MDA-MB-436
	ccl_HCC1395
	ccl_MDA-MB-157
	ccl_JMT-1
	ccl_HCC1937

FIG.. 6D (Continuación)

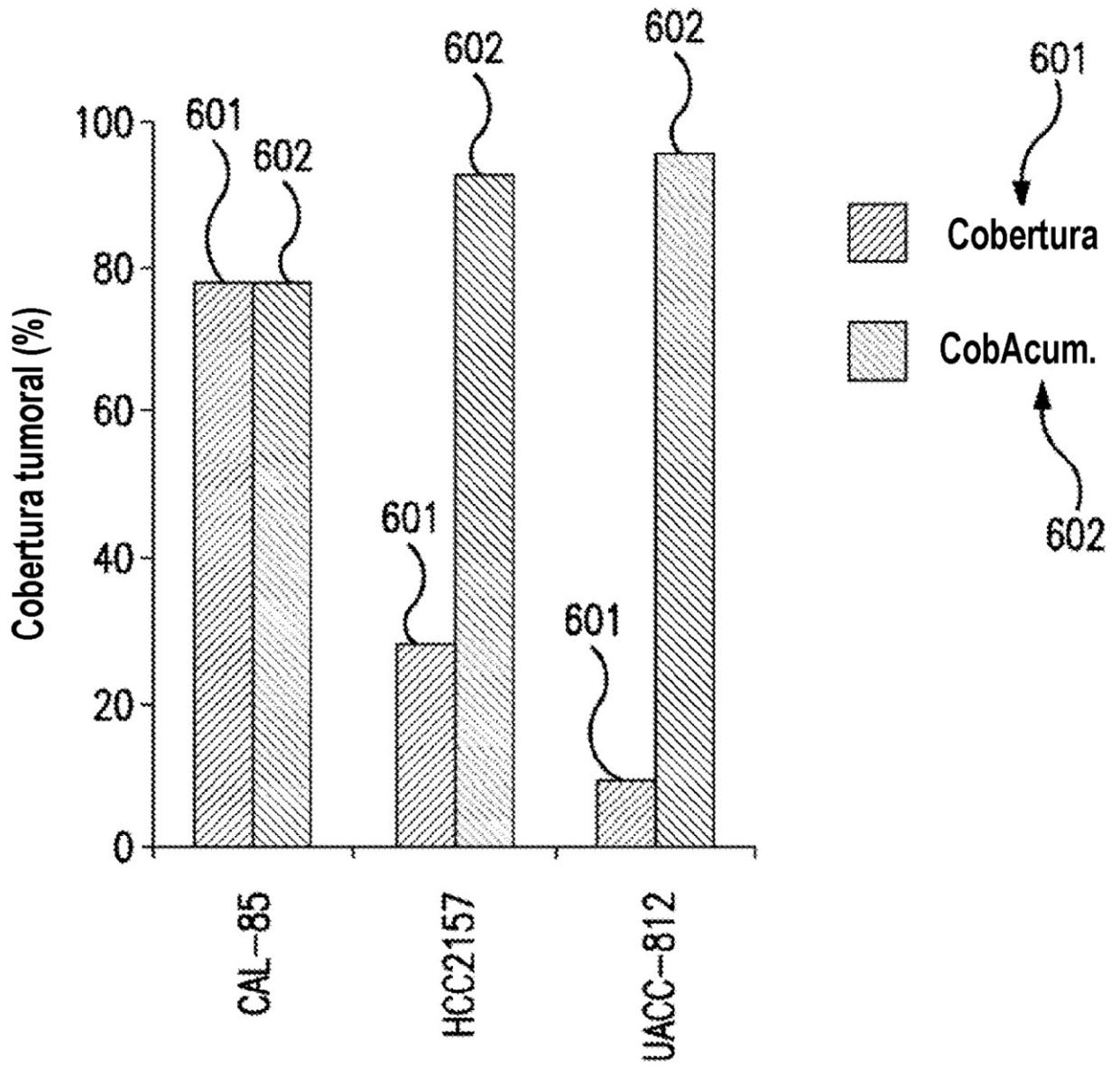


FIG. 6E

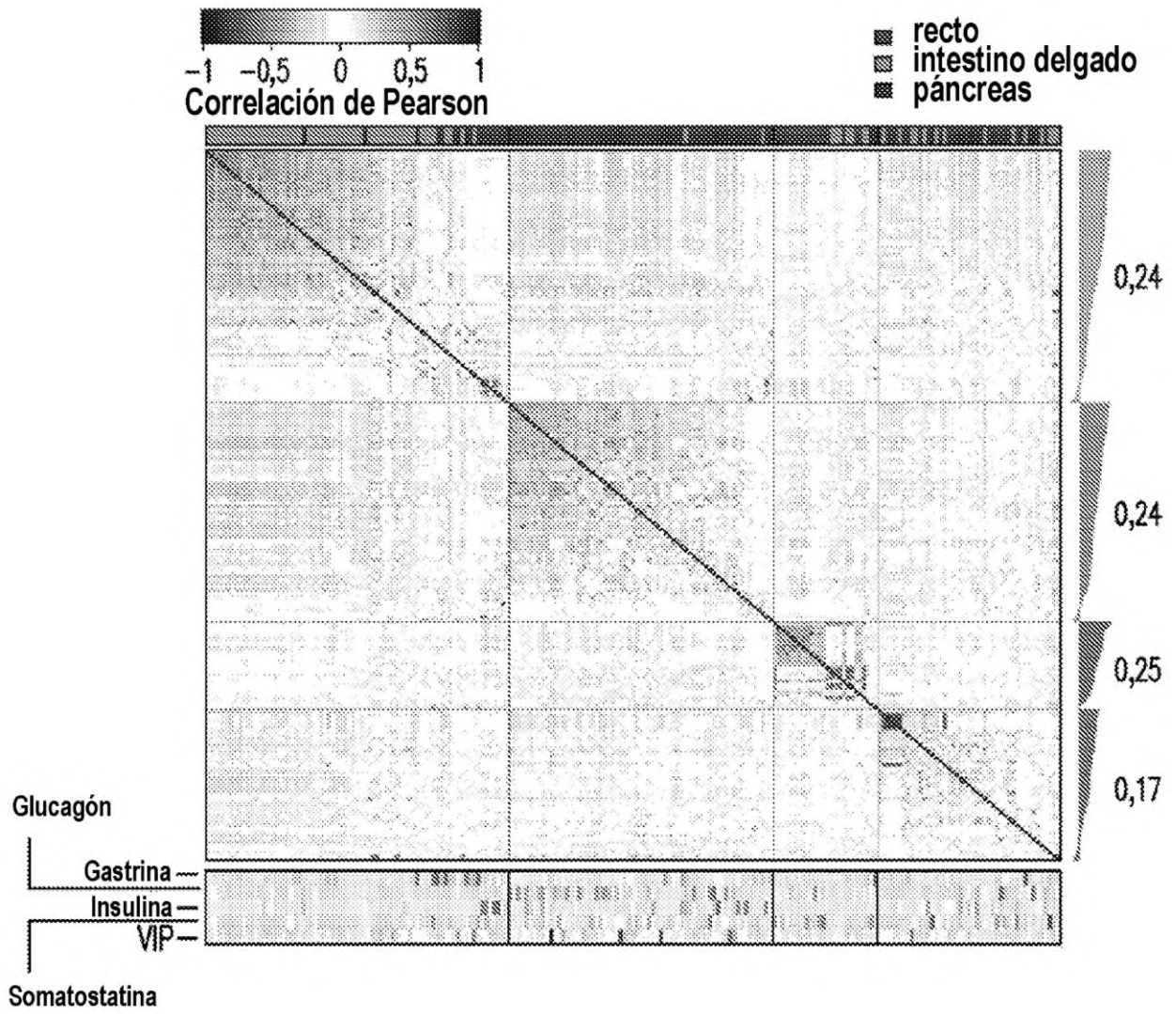


FIG. 7A

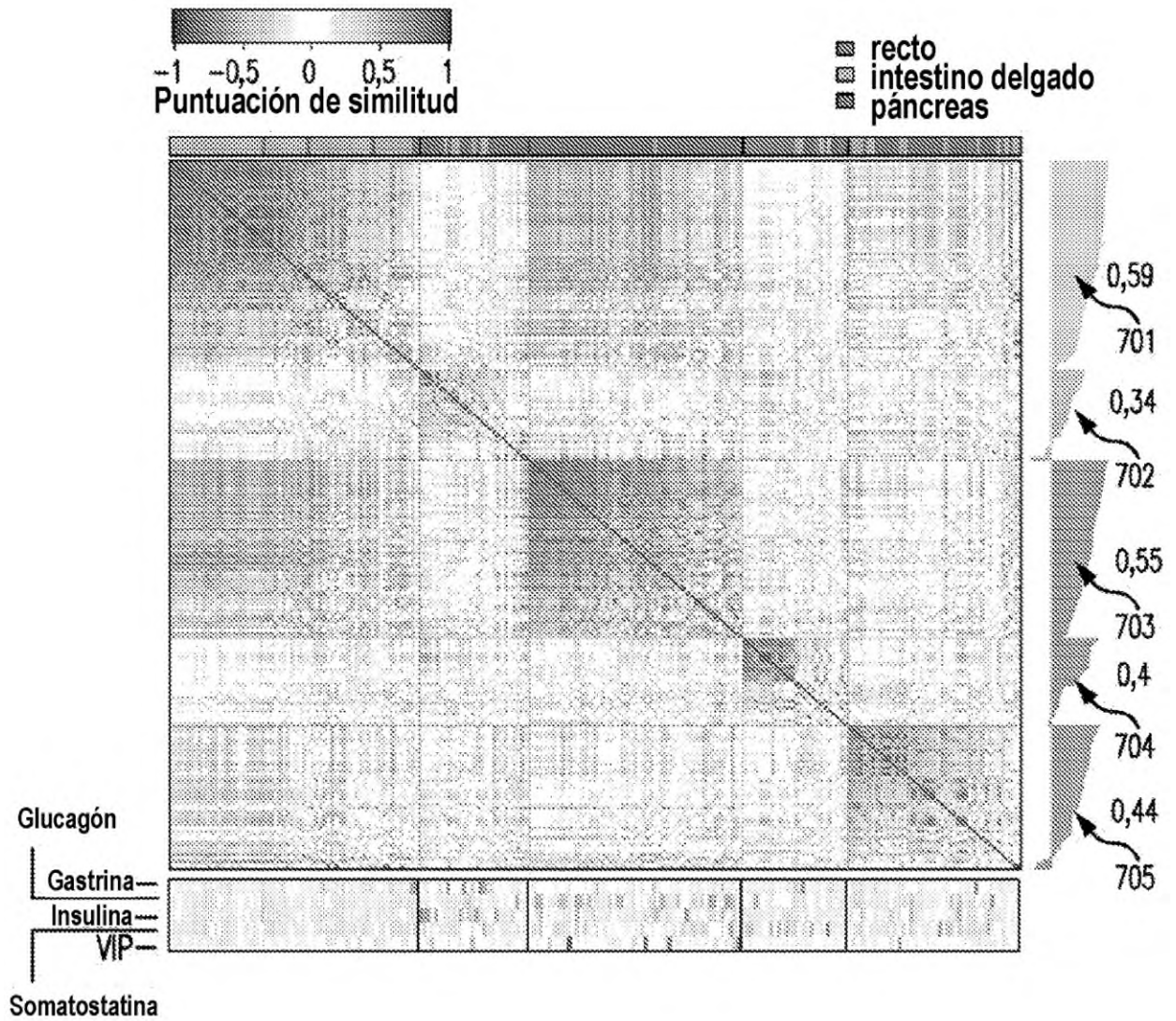


FIG. 7B

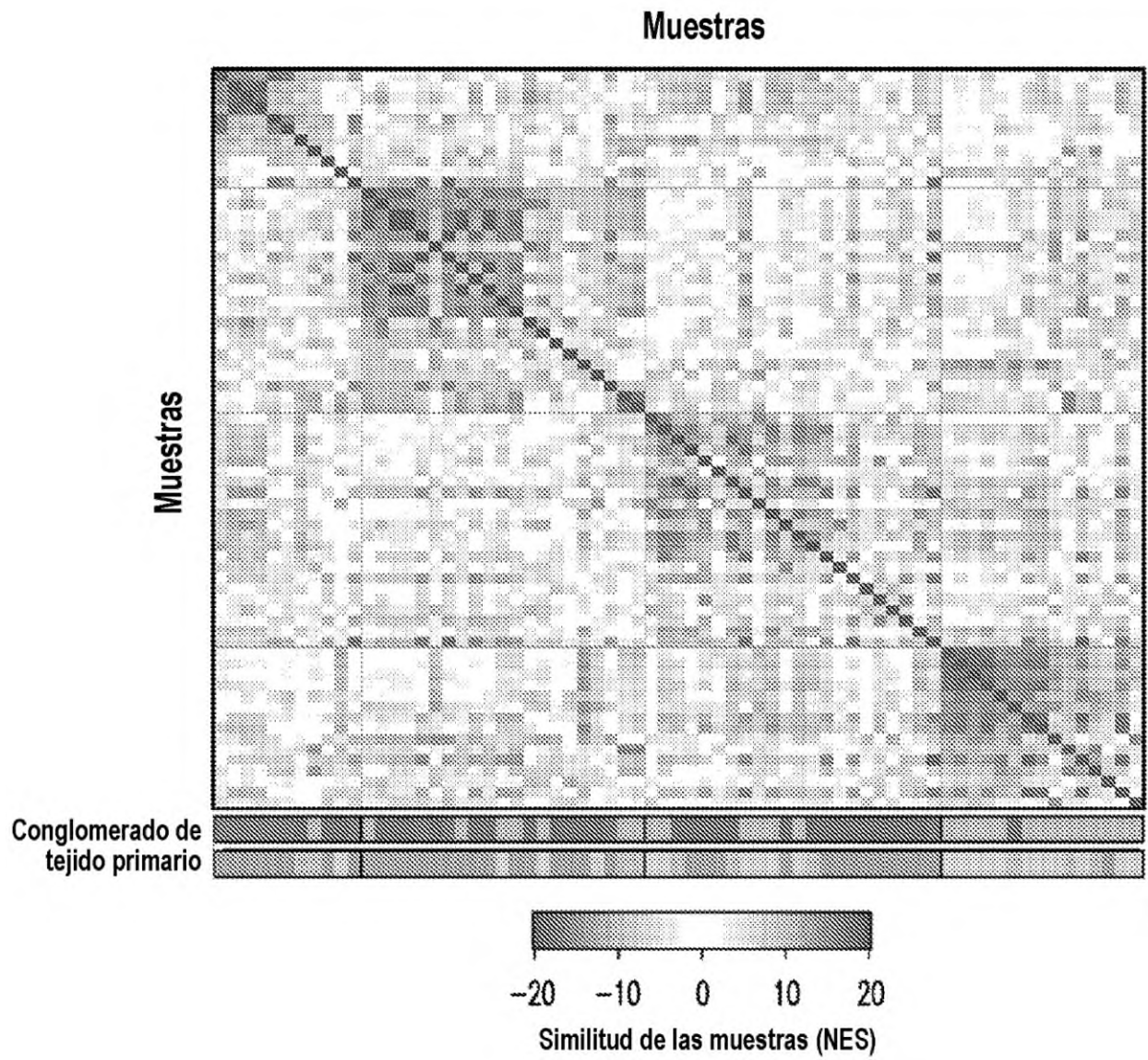
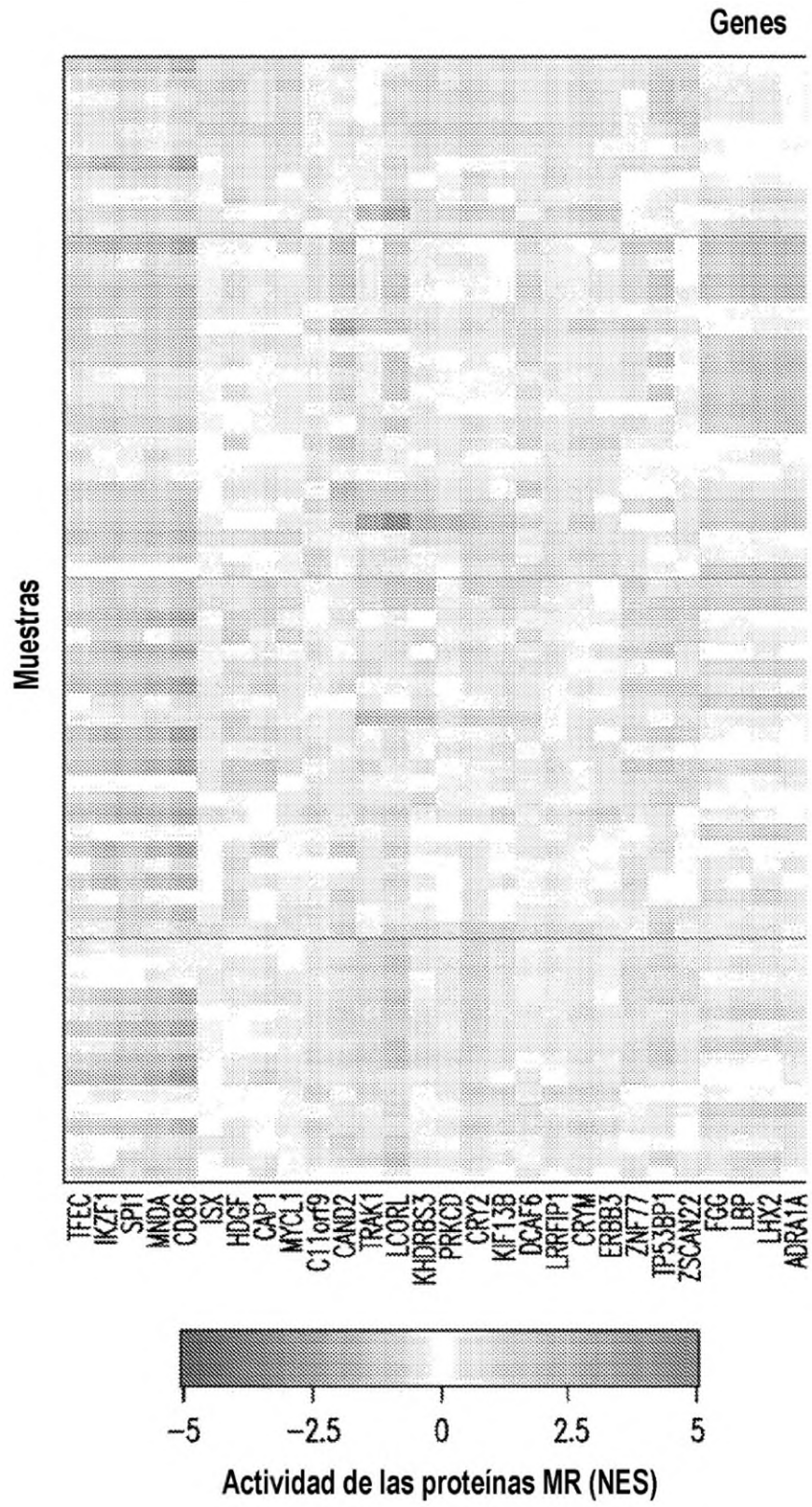


FIG. 8A



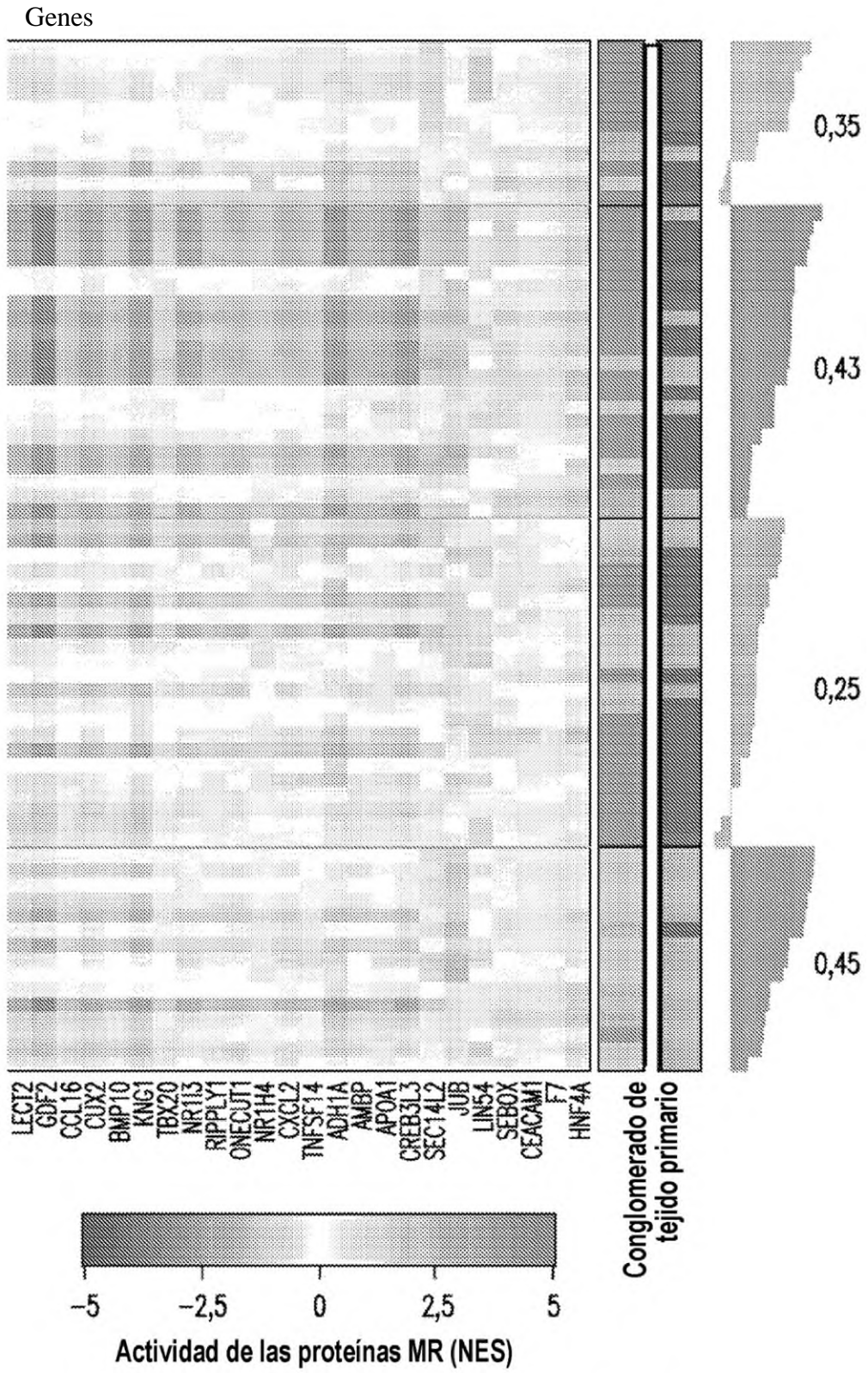


FIG. 8B (Continuación)

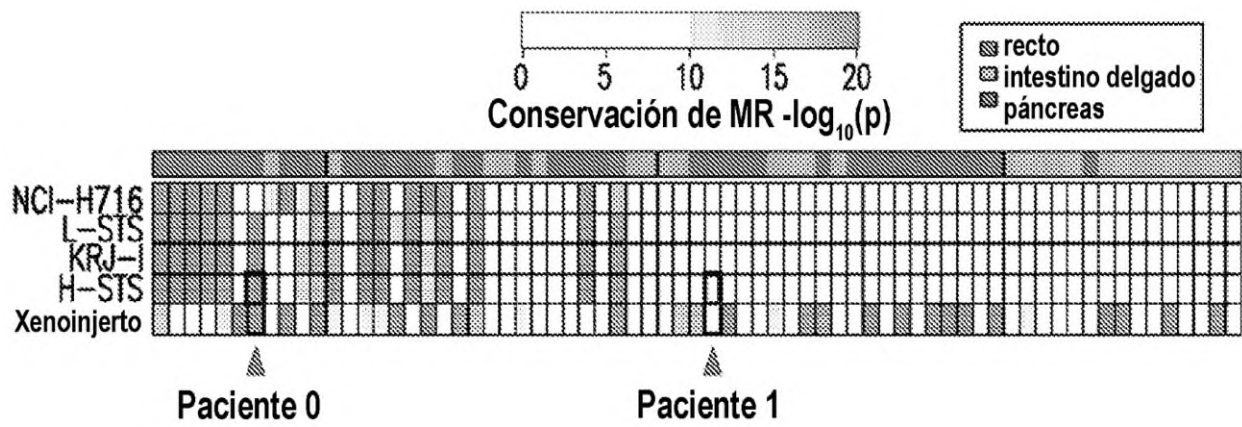


FIG. 9A

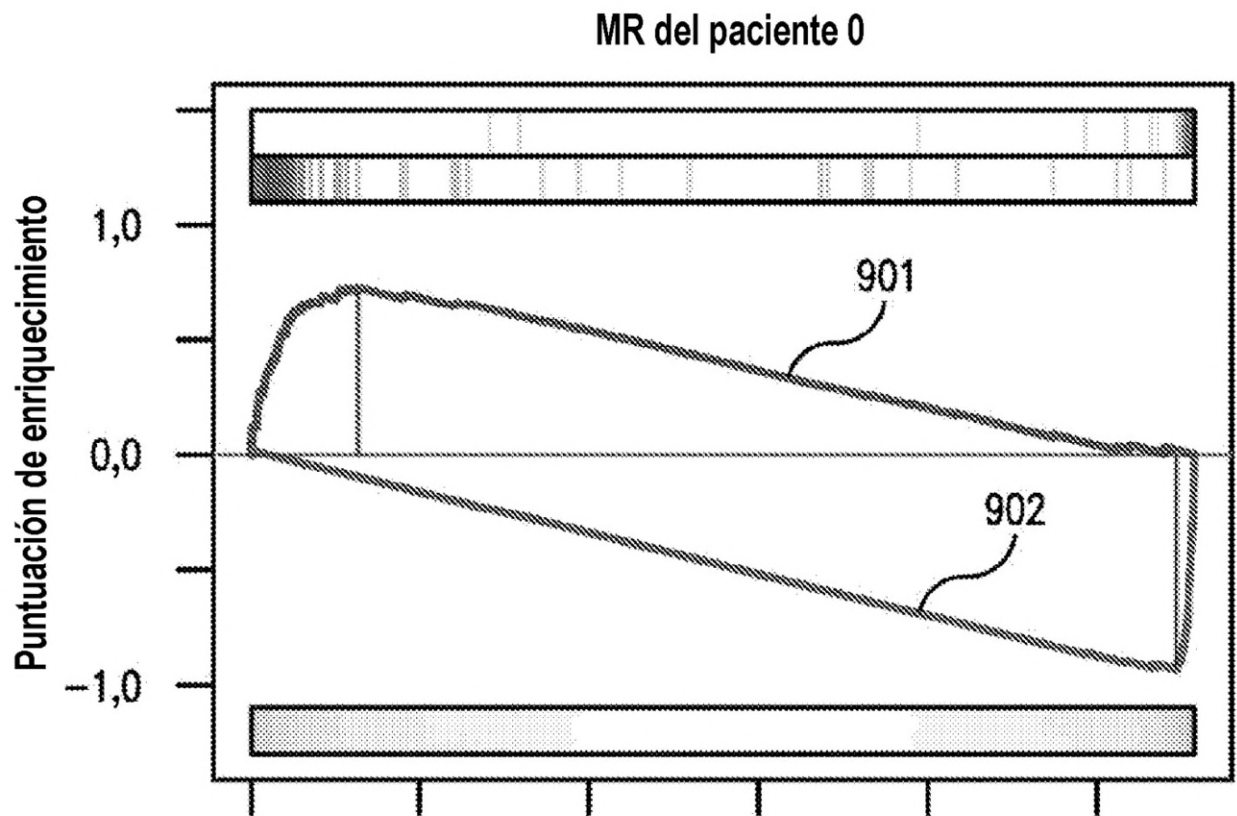


FIG. 9B

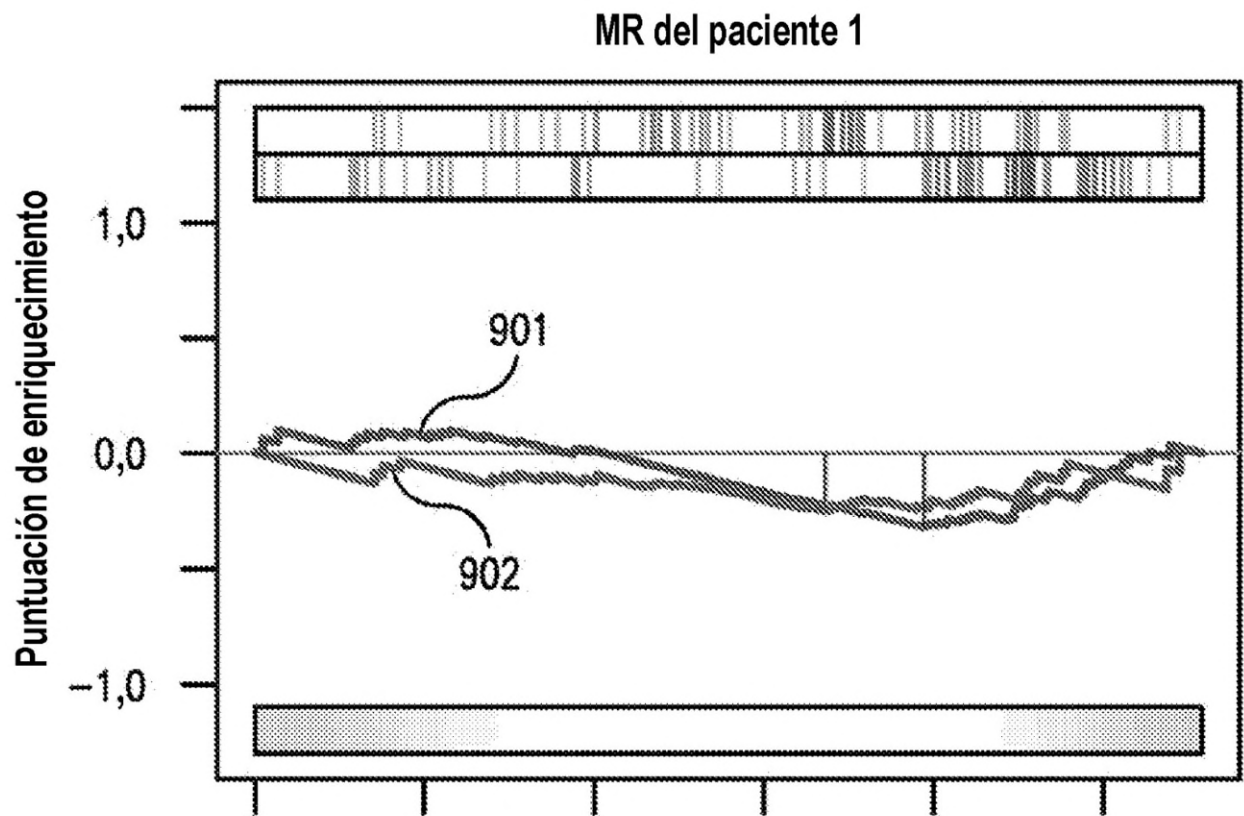
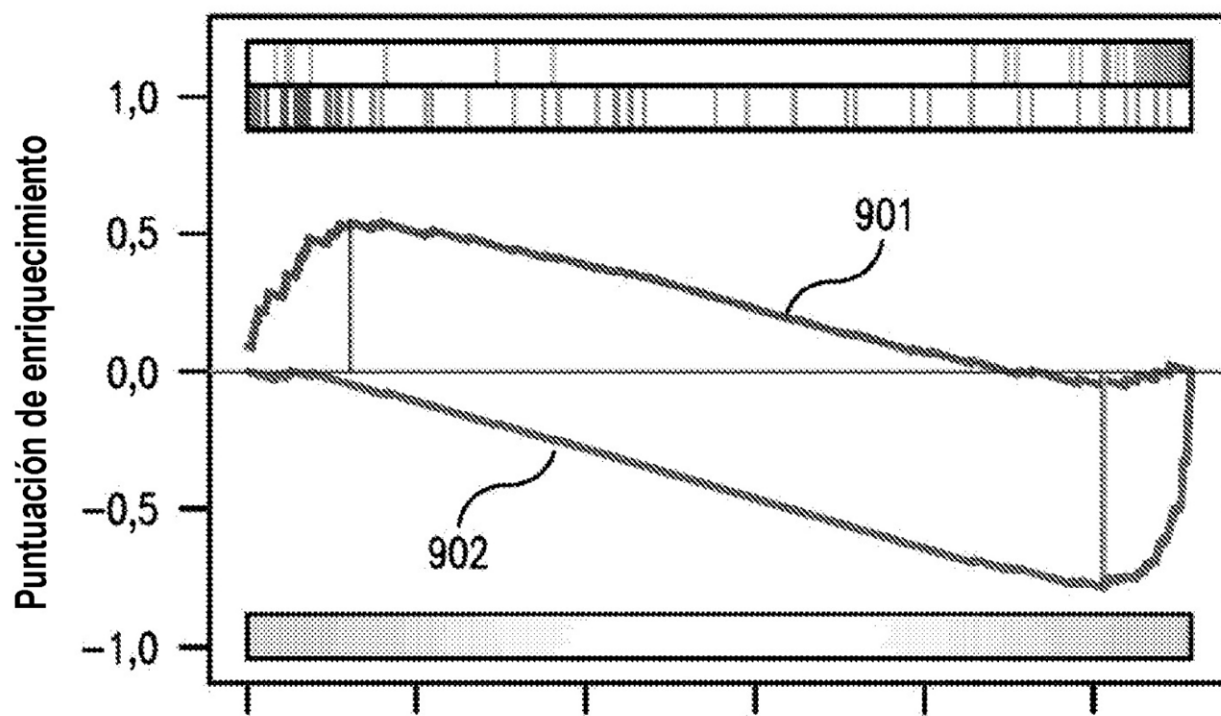


FIG. 9C

Actividad de MR de xenoinjerto H-STS



Actividad de MR de H-STS

FIG. 9D

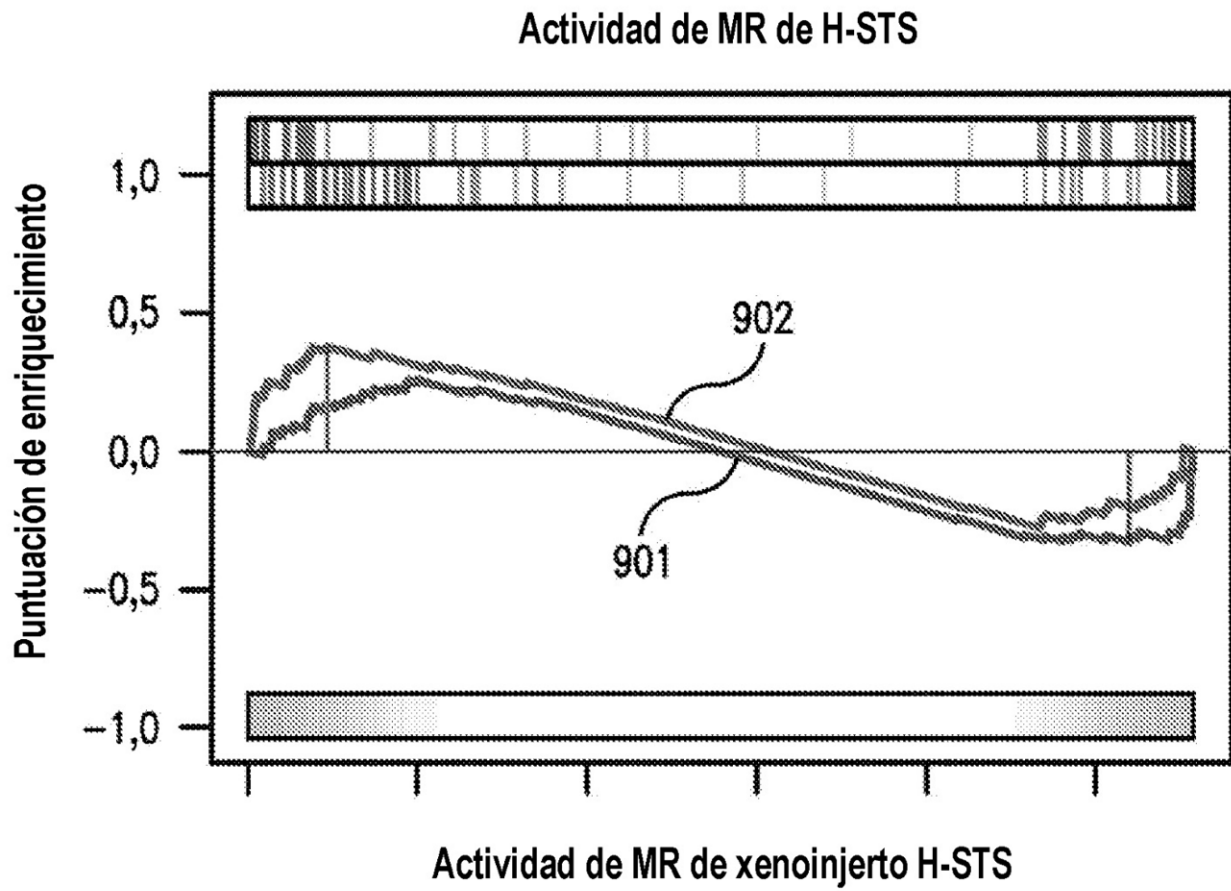


FIG. 9E

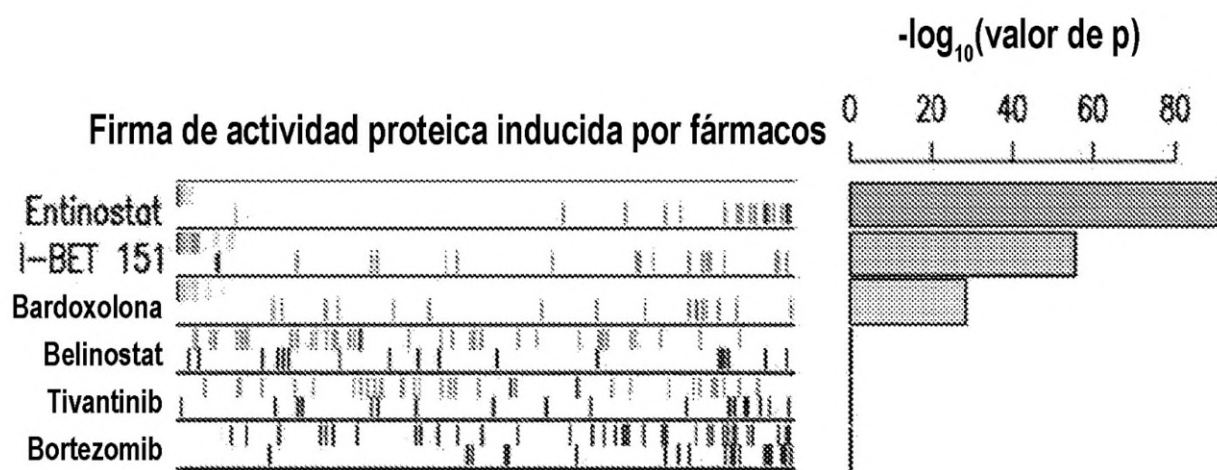


FIG. 10A

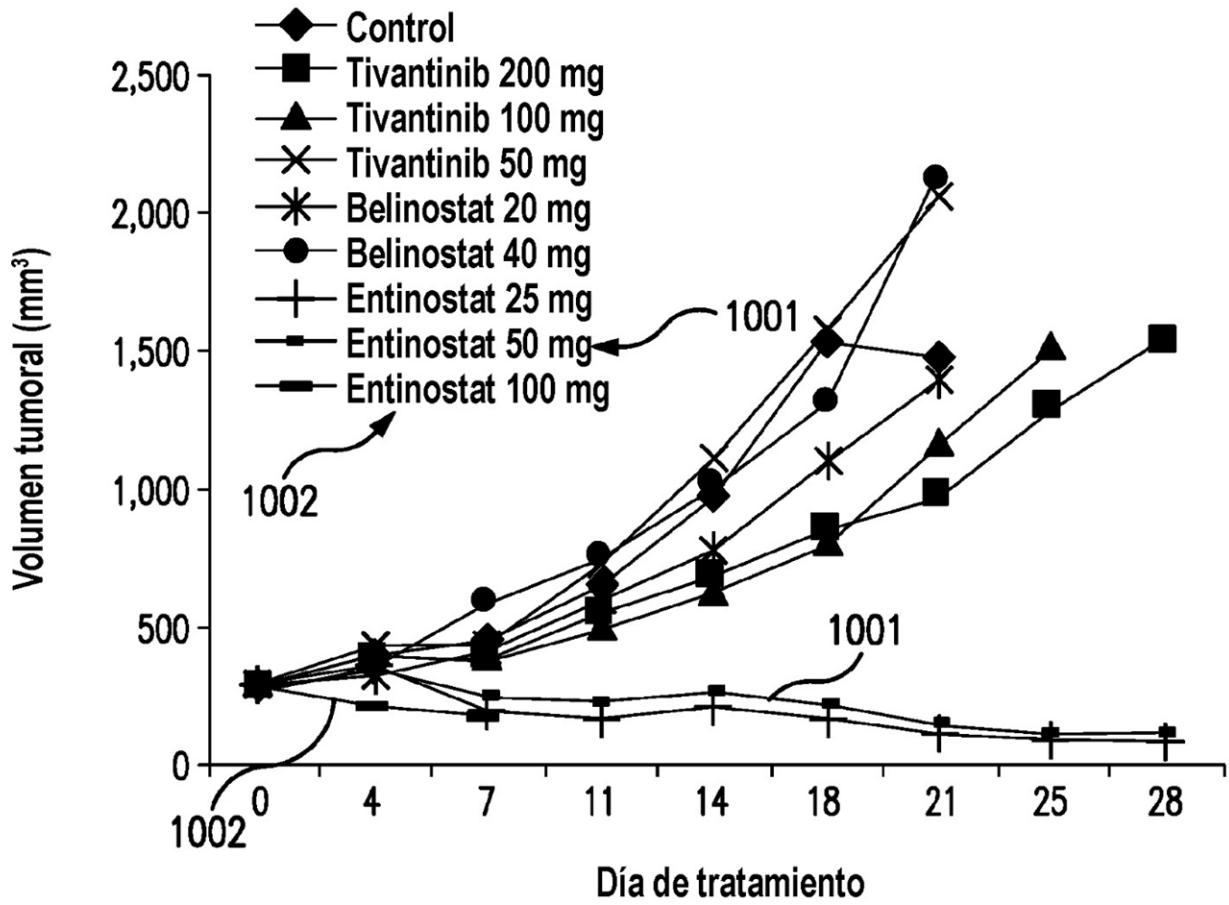


FIG. 10B

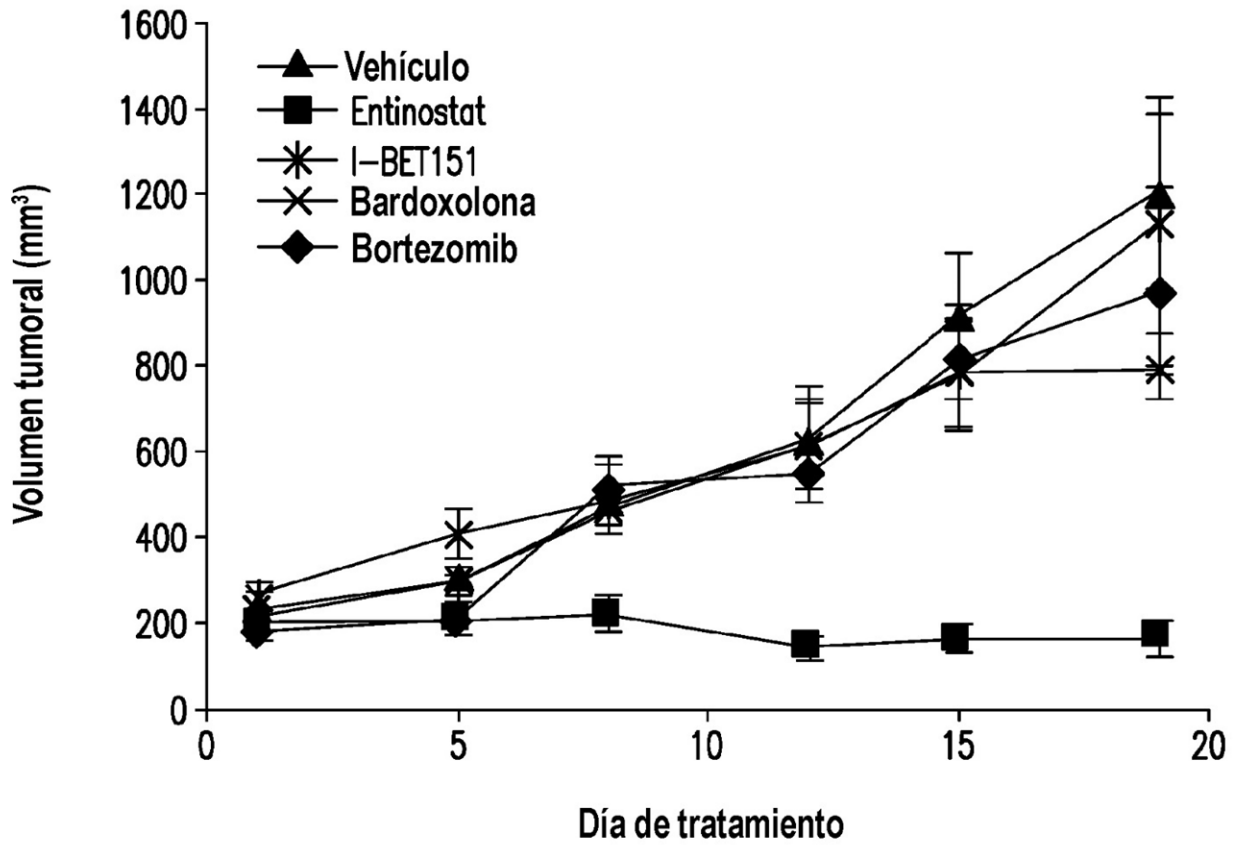


FIG. 10C

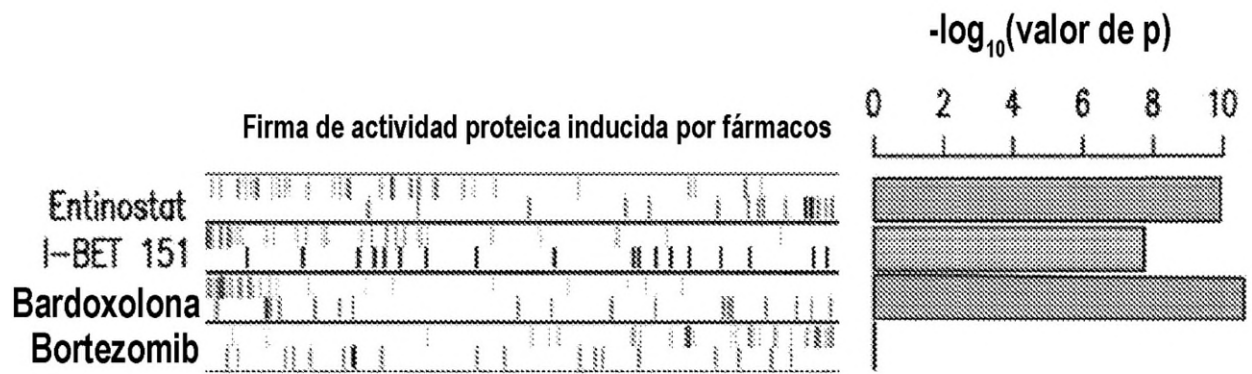


FIG. 10D

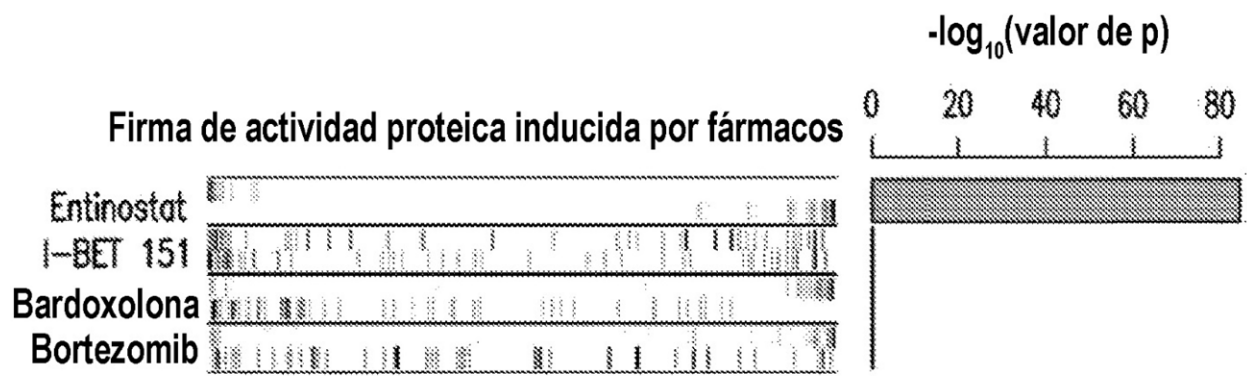


FIG. 10E

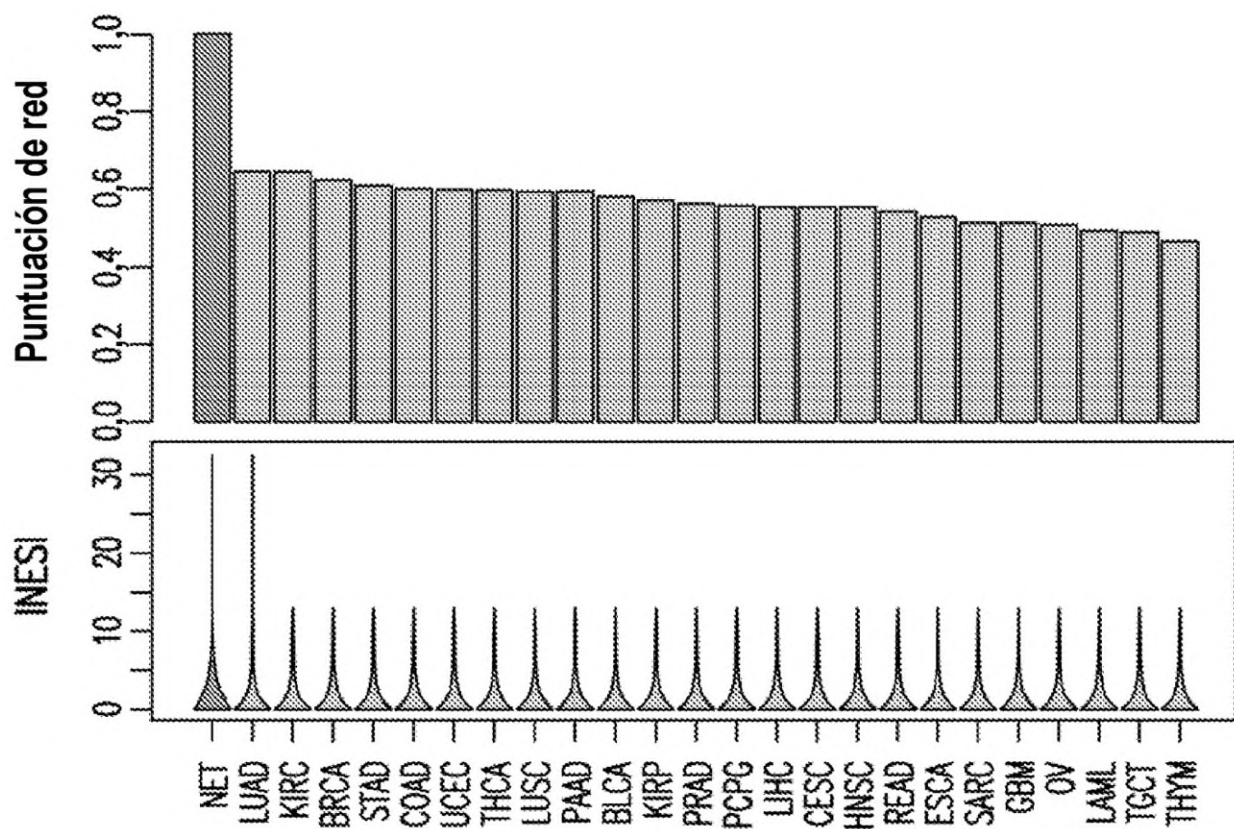


FIG. 11

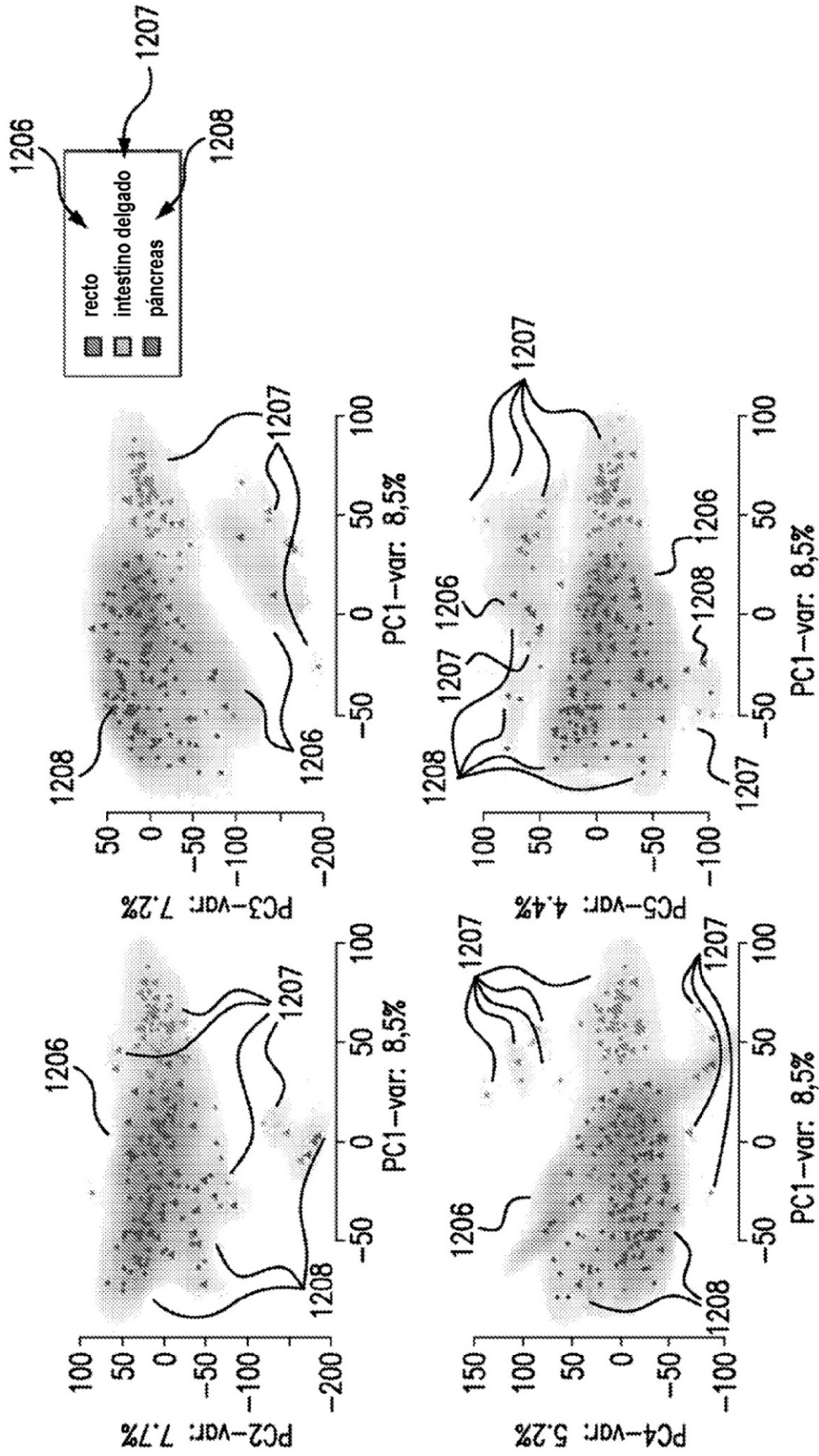


FIG. 12A

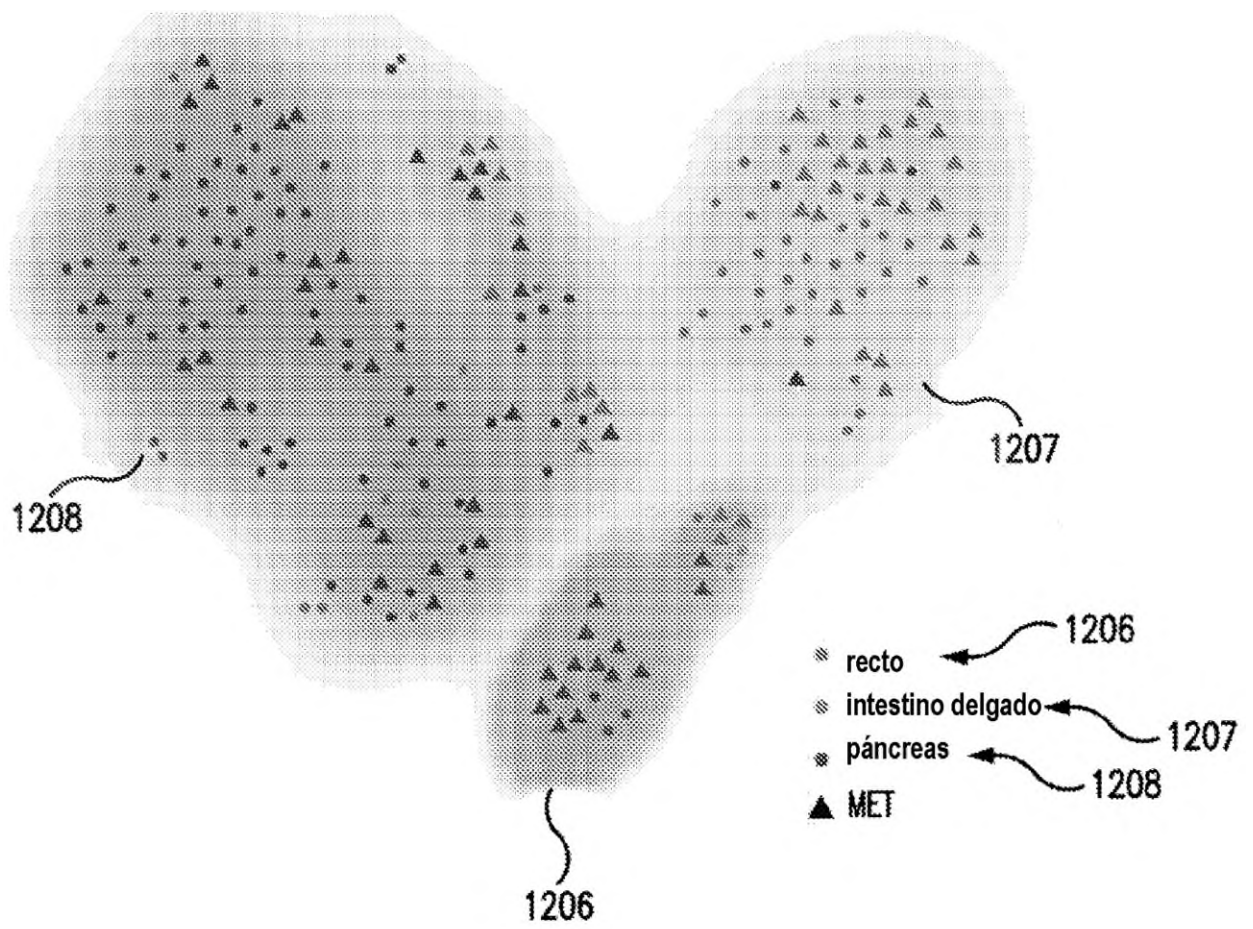


FIG. 12B

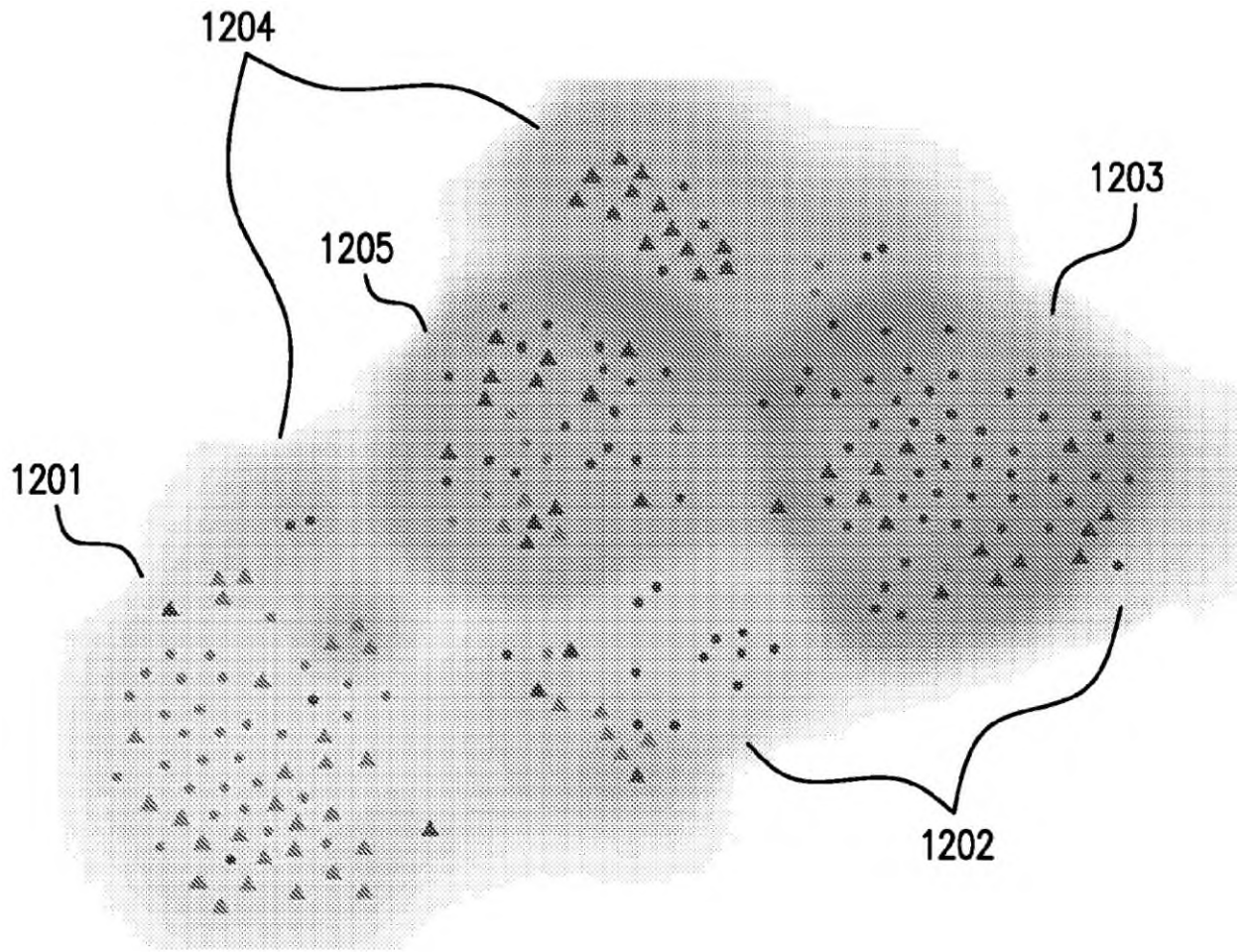


FIG. 12C

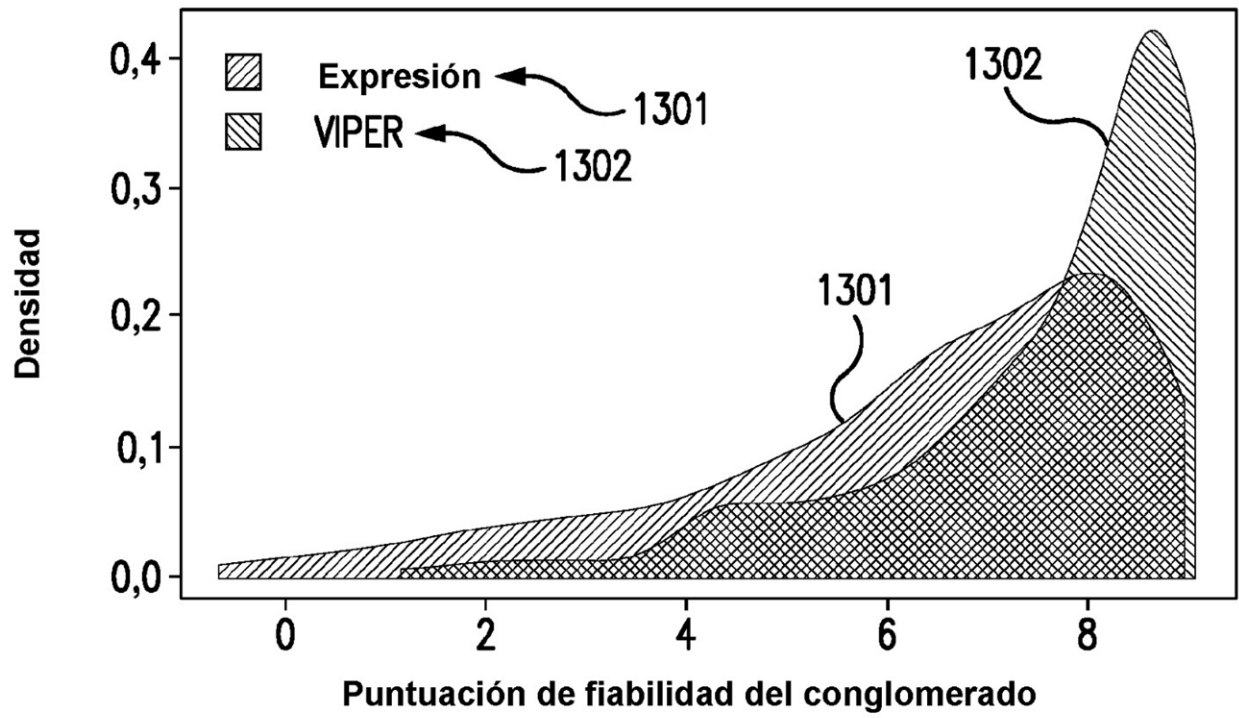


FIG. 13A

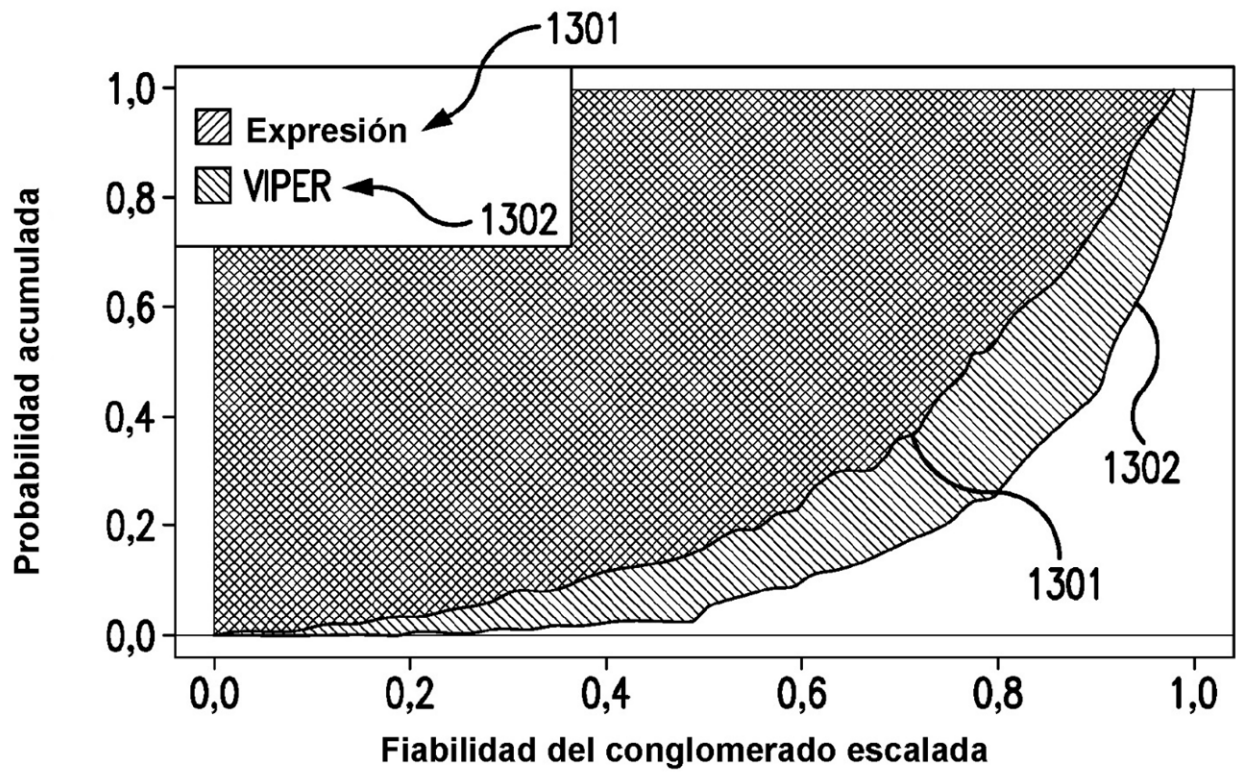


FIG. 13B

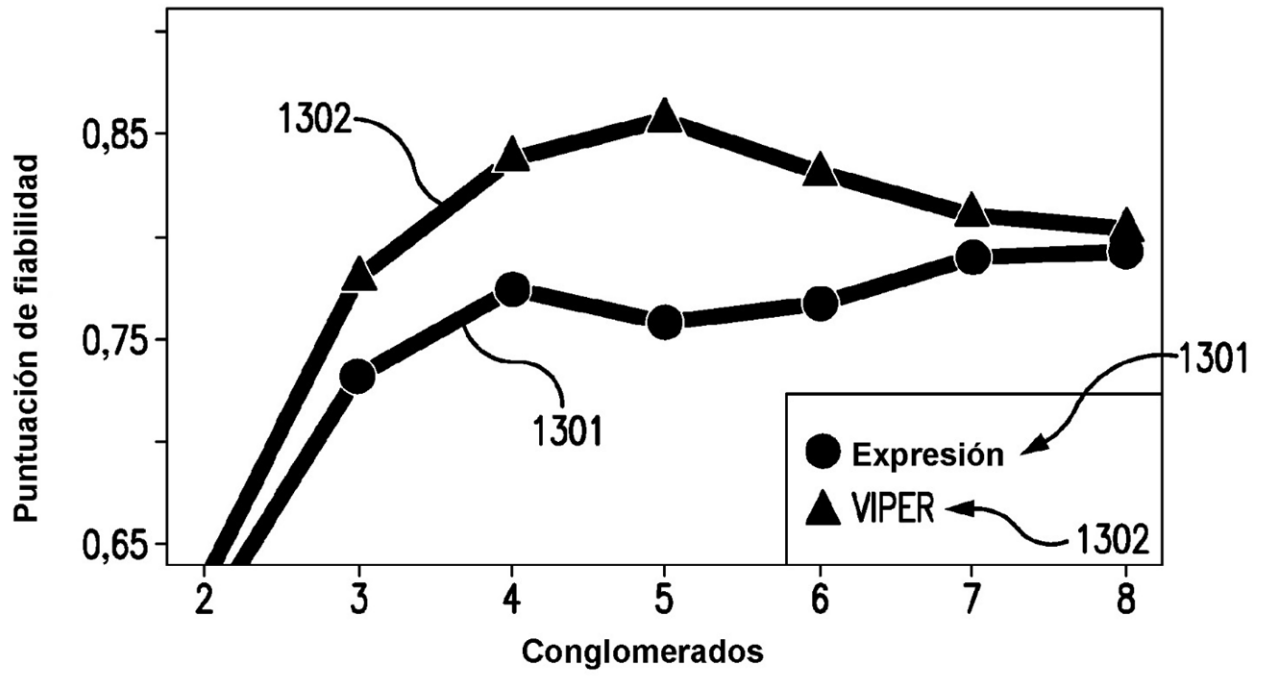


FIG. 13C

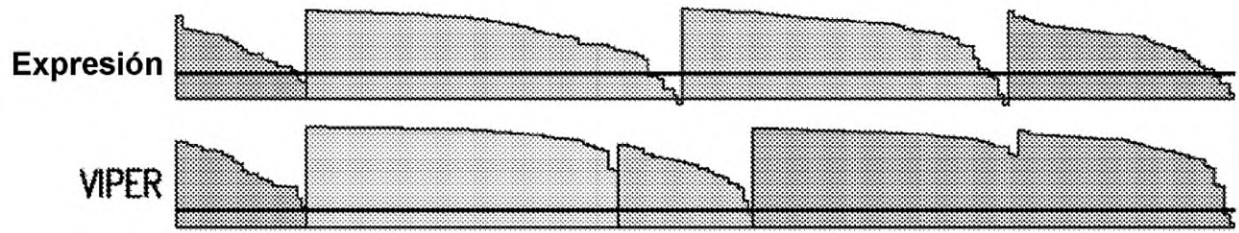


FIG. 13D

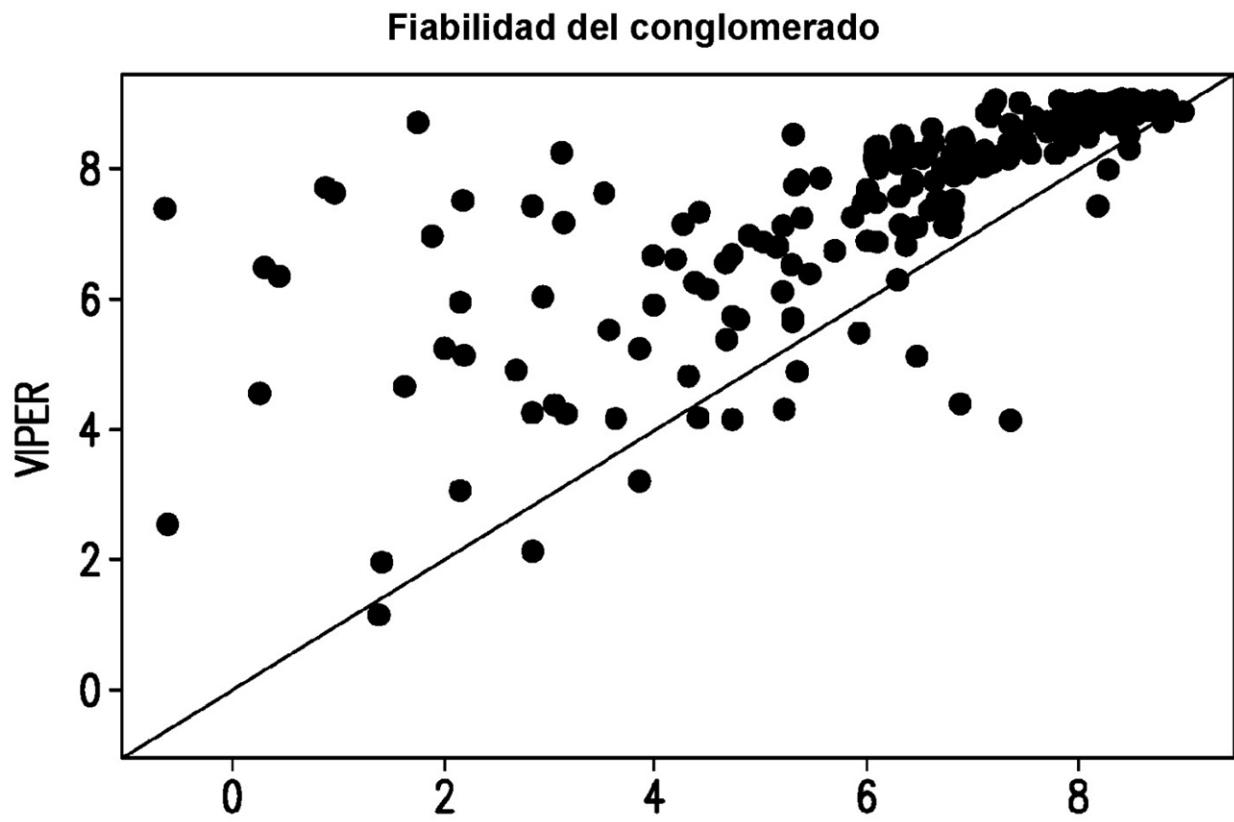


FIG. 13E

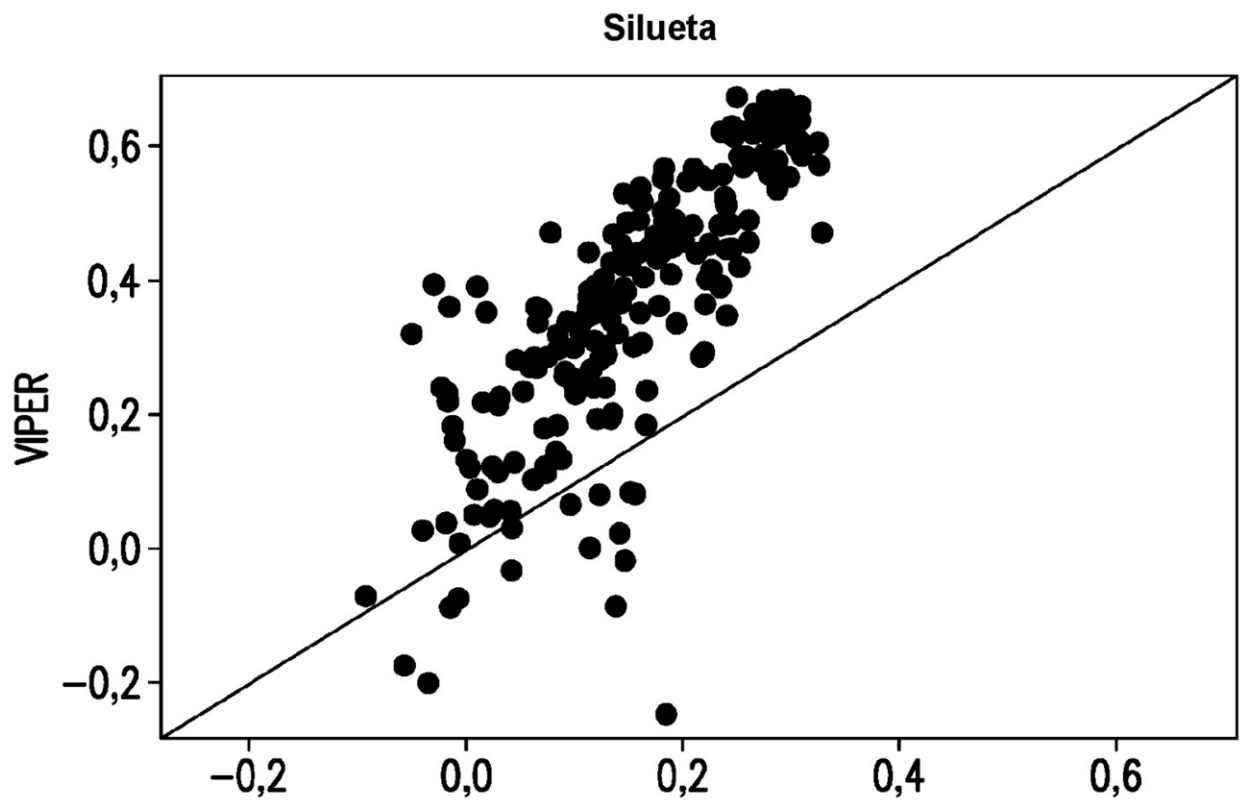


FIG. 13F

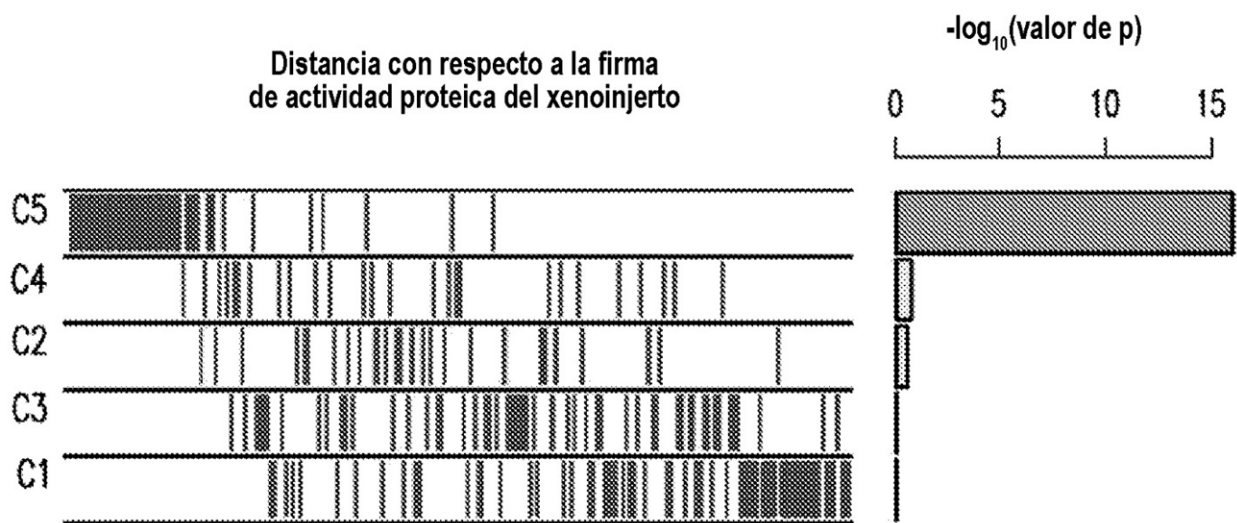


FIG. 13G

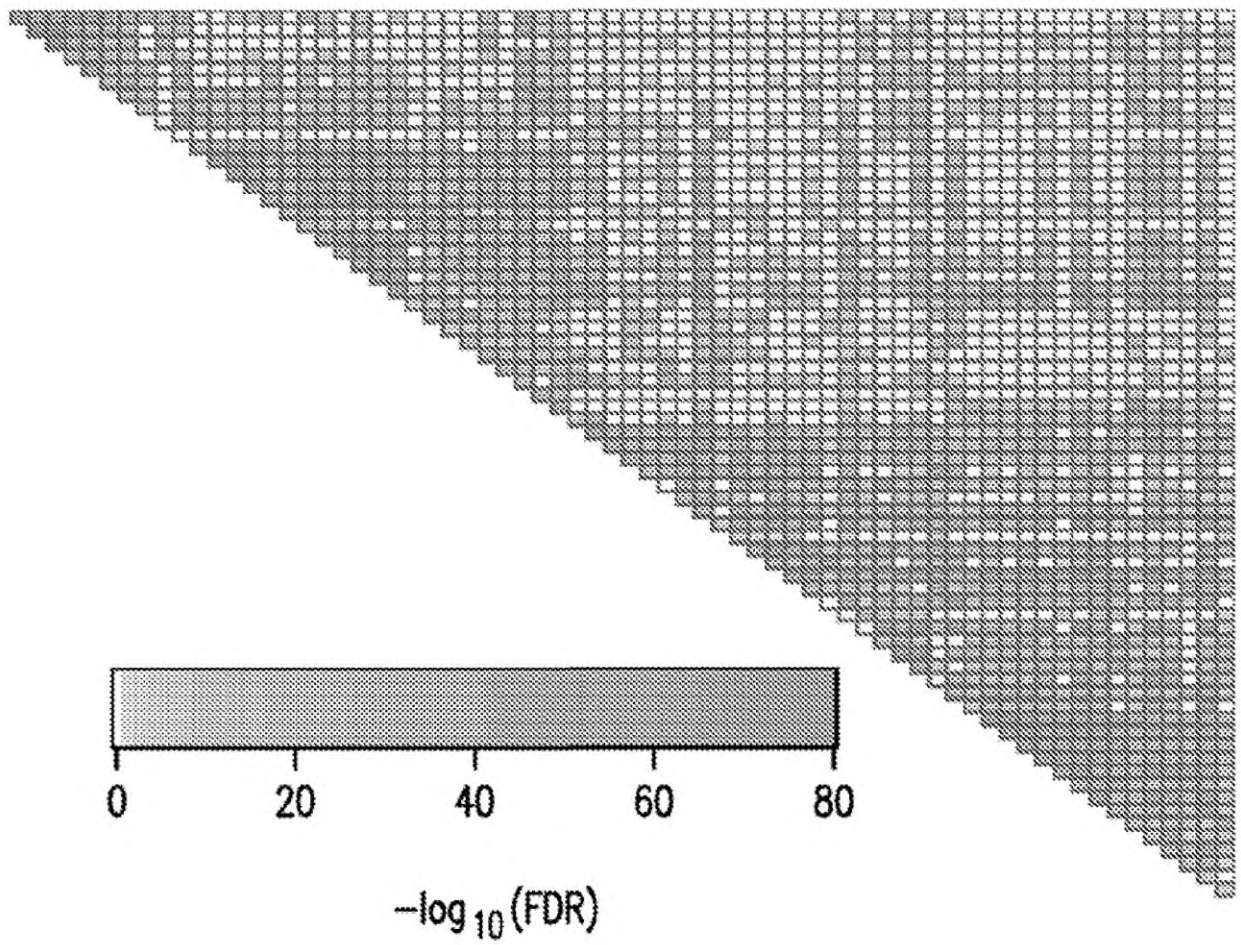


FIG. 14A

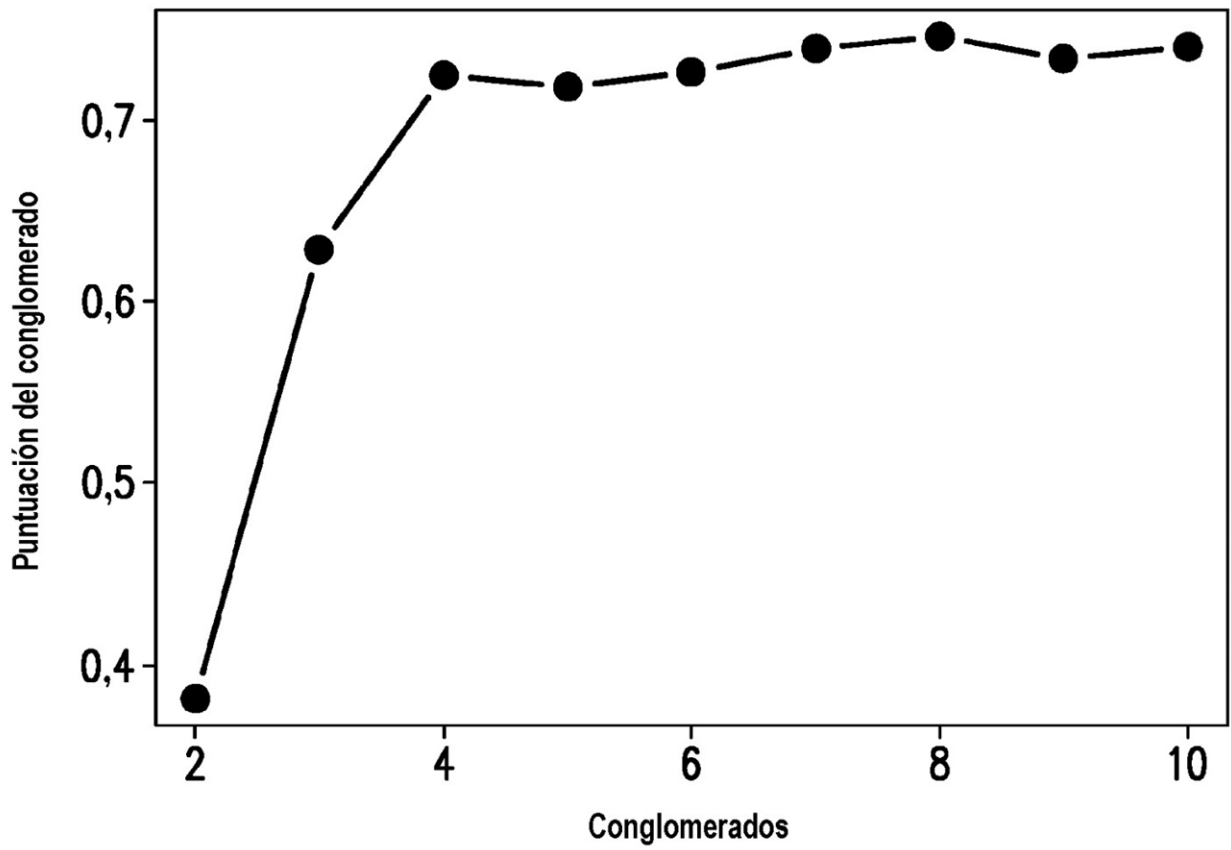


FIG. 14B

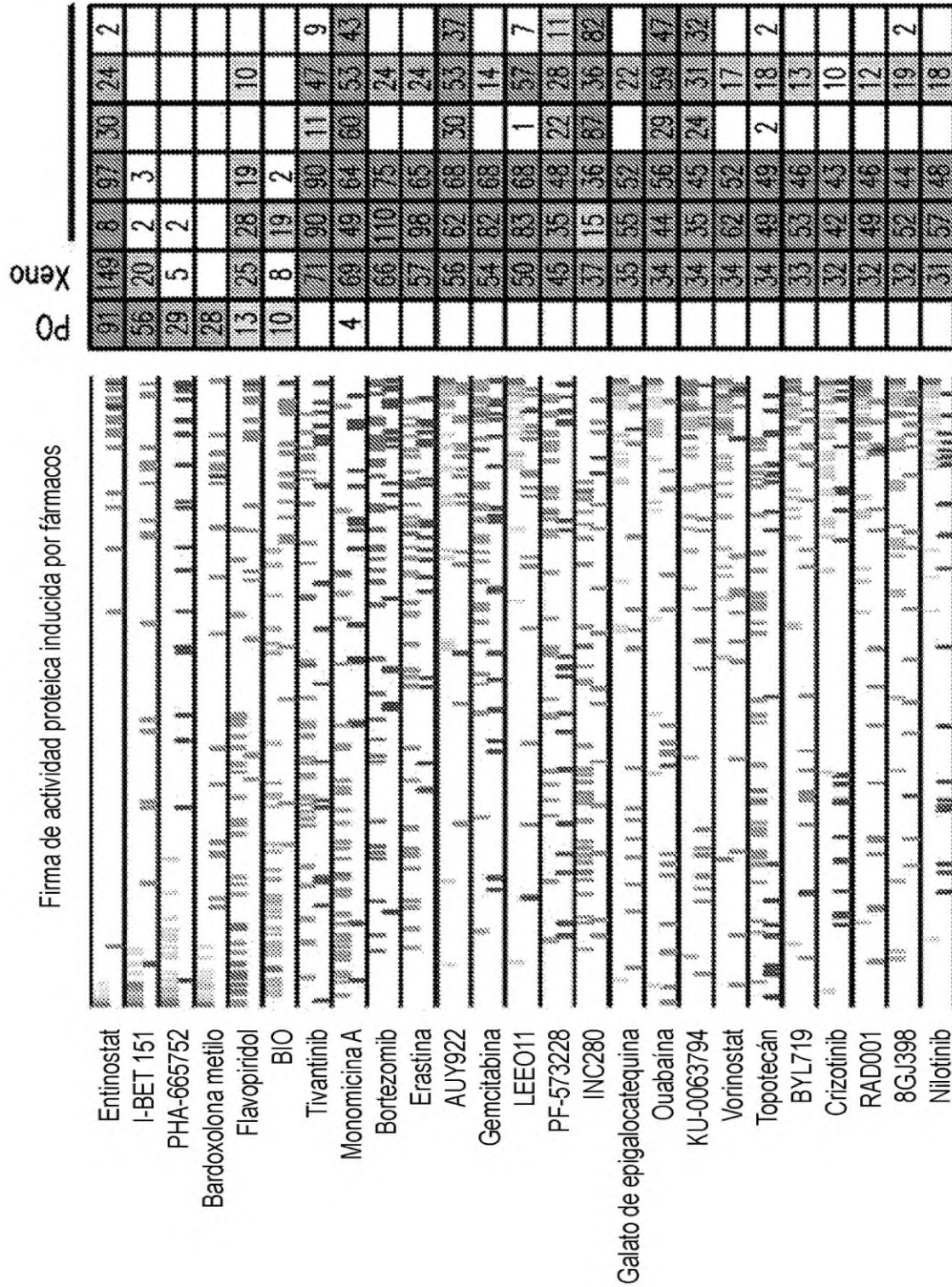


FIG. 15

Metástasis de EP-NET recapituladas por xenoinjerto H-ST5

28	34	67	3	45	64	79	25	8	52	25	34	7	8	14	61	96	20	66	2	38	81	54	25	
		5		20	20	26		8			3				6	50		14		8	18	11		
						20										18		6		10				
						1										1				1				
5		10		15	2	10	1								2	13	4	4	2	2	2	1	2	
		14		14		1										11	12							
57	35	37	3	54	93		15	3	44	11	23	8	12	35	9	7	19	43	9	4	5	13		
54	38	14	23	27	53	14	15	19	40	13	43	15	26	37	15	14	12	19	22	8	19	14	7	
17	2	35		69	30		9		7	9				8	10	4	14	19		2	3	18		
26	9	41		85	34		3		9	2		2		4	3	8	4	32				9		
50	39	16	14	31	57		8	12	34	6	27	18	23	32	25	17	8	26	15	8	13	8	4	
14	12	42		57	22		16		12	15				16	15		19	29		4	3	23		
29	18	23	11	49	18		14	15	8	9		17	8	12	17	6	12	13	7		1	5	15	
36	27	14	2	12	51	1	5	1	34	4	28	4	6	18	18	13	4	7	20	10	11	12	2	
37	38	3	34	1	44	13	5	18	44	5	59	15	61	62	21	14	4	5	15	27	14	17	19	44
29	16	22		36	37		13		19	11	4	2	1	22	6		13	19	4		1	15		
47	49	5	38	26	16		20	31	9	16	10	31	45	41	34	2	16	1	24			25	12	
38	44	12	99	14	51		8	6	37	4	24	15	12	25	22	9	8	18	13	4	8	1	5	
12	13	26		45	13		14	2	8	12		6			11	8	1	18	12		2	4	22	
31	22	19		30	60		6		29	5	1	3	1	25	6	1	11	24	4	1	1	1	7	
21	13	20		35	29		5		12	3	1			11	2		7	15					8	
21	13	16		26	38		5		17	5	4			12	7	1	8	13		2	3	8	8	
24	17	18		31	32		3		16	2		3		12	3		6	16			1	6	6	
21	11	18		30	29				14			3		4	2	1		20					2	
19	18	22		41	19		7		10	5		8		10	2		9	14					12	

FIG. 15 (continuación)

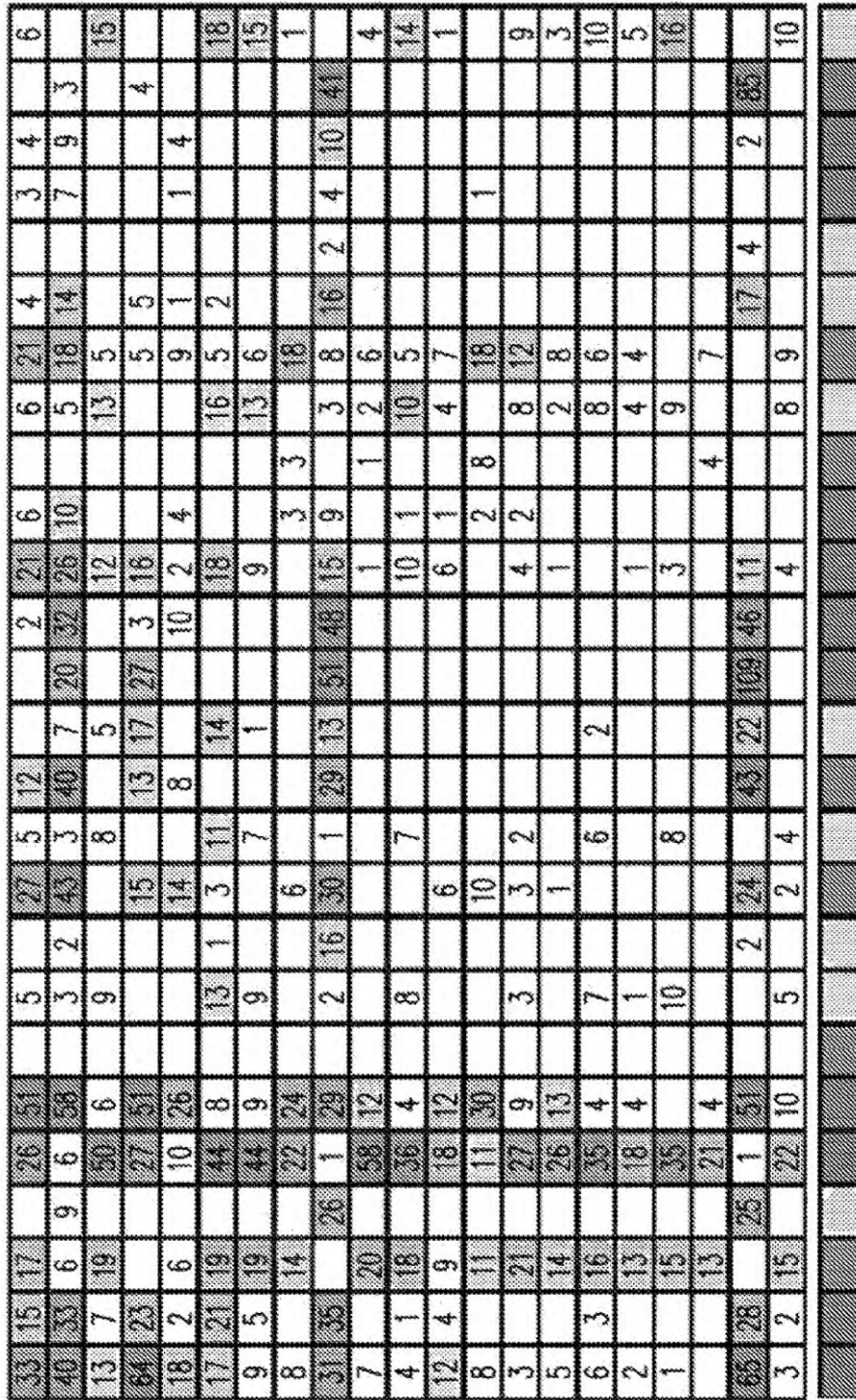


FIG. 15 (continuación)