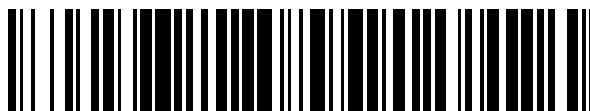


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 841**

51 Int. Cl.:  
**G06F 19/00** (2011.01)  
**C12Q 1/00** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05735396 .3**  
96 Fecha de presentación: **11.04.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1737972**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.01.2007**

54 Título: **Interacciones proteína-proteína para realización de perfiles farmacológicos**

30 Prioridad:  
**12.04.2004 US 560975 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.10.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.10.2012**

73 Titular/es:  
**ODYSSEY THERA, INC.**  
**4550 NORRIS CANYON ROAD, SUITE 140**  
**SAN RAMON, CA 94583, US**

72 Inventor/es:  
**WESTWICK, John K.;**  
**KEON, Brigitte;**  
**MacDONALD, Marnie y**  
**MICHNICK, Stephen William Watson**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 387 841 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**

Interacciones proteína-proteína para realización de perfiles farmacológicos

**Antecedentes de la invención**

5 El documento US 2004/063088 desvela procedimientos para analizar el efecto de un agente biológicamente activo en rutas celulares para establecer conjuntos de datos de biomapas, que comprenden el uso de ELISA basados en células en un panel de combinaciones de ensayo.

10 El concepto de fármacos selectivos ha dominado el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos durante el último siglo. Una molécula puede ser un agente terapéutico potencialmente útil si se puede demostrar que efectúa de forma selectiva un cambio en la fisiología celular actuando de una manera deseada en una diana dentro de la rutas bioquímicas que subyacen a los procesos de interés. Sin embargo, incluso un compuesto químico extremadamente selectivo que se una a una diana terapéutica puede tener efectos completamente inesperados o “fuera de ruta” cuando se pone en contacto con una célula viva. Tale efectos pueden dar como resultado fallos preclínicos y clínicos caros. Para los fines de la presente invención, los inventores definen actividad “fuera de ruta” como cualquier actividad de un compuesto en una ruta distinta de la diana pretendida del compuesto.

15 La identificación de mecanismos de acción de fármacos y sus actividades fuera de ruta no puede conseguirse con ensayos enzimáticos debido a que no es factible preparar un ensayo para cada una de las decenas de miles de proteínas que representan el medio biológico. Para evaluar el modo de acción de un fármaco dentro de las complejas rutas bioquímicas que componen una célula viva, se necesita un medio para explorar las rutas directamente. Por lo tanto, los inventores buscaron una estrategia general para realización de perfiles farmacológicos. En particular los inventores buscaron determinar si podrían usarse medidas cuantitativas de interacciones proteína-proteína para realizar los perfiles de la actividad farmacológica a gran escala.

20 Los antecedentes para la presente invención son como siguen. La unión de agonistas a receptores induce una cascada de acontecimientos intracelulares mediada por otras moléculas de señalización. Conceptualmente tales cascadas de señalización implican la asociación y disociación reguladas de proteínas dentro de complejos macromoleculares. Además, el ensamblaje y desensamblaje de complejos proteína-proteína se produce de forma dinámica tras la adición de un agonista, antagonista o inhibidor de una ruta. Finalmente, el ensamblaje y desensamblaje de complejos proteína-proteína específicos se produce en localizaciones subcelulares particulares tales como la membrana celular, citoplasma, núcleo, mitocondria u otros compartimentos dentro de la célula.

25 La mayoría de los perfiles farmacológicos basados en células hasta la fecha se han realizado con micromatrices de ADN (microplacas génicas o chips génicos). Las micromatrices de ADN han originado el campo de la toxicogenómica, que implica el uso de poblaciones complejas de ARNm para entender la toxicidad. Las células, o animales completos, se tratan con fármacos; se aísla ARN mensajero de la célula o tejido; y se comparan los patrones de expresión génica del ARNm en ausencia y presencia de un fármaco. Tal realización de perfiles transcripcionales puede revelar diferencias entre compuestos, cuando los compuestos afectan a la actividad transcripcional en última instancia de una o más rutas. La identificación de rutas específicas que se estimulan o reprimen en respuesta a condiciones o tratamientos específicos es una forma útil de comenzar a desentrañar los mecanismos celulares de enfermedad y respuesta a fármaco. Sin embargo, los cambios en el nivel de moléculas de ARNm individuales no siempre se correlacionarán directamente con el nivel de actividad de la proteína correspondiente en un punto temporal sencillo. Además, muchas proteínas experimentan numerosas modificaciones post-traduccionales e interacciones proteicas, que pueden afectar a las funciones y actividades de las proteínas dentro de un tejido o célula. Por lo tanto, simplemente identificar todas las especies de ARNm presentes y los niveles a los que están presentes en un momento particular, puede no producir la imagen completa de un fármaco particular. Finalmente, un fármaco diana puede afectar a la transcripción de docenas de genes, haciendo la interpretación de los resultados de experimentos de microplacas génicas una tarea ardua.

30 La regulación de respuestas celulares está mediada por un cierto número “umbral” de interacciones moleculares que con el tiempo alcanzan el núcleo celular e inducen que el aparato génico de la célula sintetice proteínas de nueva expresión en respuesta a los estímulos iniciales. Los ensayos de gen indicador acoplan la actividad biológica de una diana con la expresión de una enzima fácilmente detectada o indicador proteico, permitiendo controlar los acontecimientos celulares asociados con la transducción de señales y expresión génica. Basándose en la fusión de elementos de control transcripcionales con una diversidad de genes indicadores, estos sistemas “indican” los efectos de una cascada de acontecimientos de señalización en la expresión génica dentro de las células. Pueden insertarse repeticiones sintéticas de un elemento de respuesta particular corriente arriba del gen indicador para regular su expresión en respuesta a moléculas de señalización generadas por activación de una ruta específica en una célula viva. Se ha demostrado que tales ensayos son útiles en exploración primaria y secundaria de bibliotecas químicas y candidatos a fármaco por sus efectos biológicos y se han usado paneles de ensayos indicadores de transcripción para realizar el perfil de la actividad farmacológica (Bionaut, Inc.). Aunque los ensayos indicadores de transcripción tienen la capacidad de proporcionar información sobre la respuesta de una ruta para agentes químicos, tales ensayos solamente miden la consecuencia de la activación o inhibición de la ruta, y no el sitio de acción del compuesto.

Las medidas directas de acontecimientos específicos dentro de la ruta de señalización eliminarían los problemas asociados con la interpretación de los perfiles de transcripción. A diferencia de los ensayos indicadores de transcripción, la información obtenida por control de una interacción proteína-proteína refleja el efecto de un fármaco en una rama particular o nodo de una ruta de señalización celular, no su punto final. Por ejemplo, la estimulación de una ruta por un agonista podría conducir a un aumento de la asociación de una proteína intracelular (tal como una quinasa) con un compañero de unión afín (tal como un sustrato). La estimulación da como resultado la fosforilación de sustrato por la quinasa. El efecto farmacológico podría por lo tanto ensayarse cuantificando la fosforilación de sustrato o la cantidad o localización del complejo quinasa/sustrato en ausencia y presencia del agonista. En este ejemplo el complejo quinasa/sustrato actúa como un centinela de la actividad de la ruta. Un fármaco que actúe al comienzo de la ruta (tal como un antagonista de receptor) o que actúe en otra diana corriente abajo del receptor podría alterar la cantidad o localización o estado de modificación del complejo quinasa/sustrato dentro de la célula. Por lo tanto, la evaluación del complejo quinasa/sustrato en ausencia o presencia de un compuesto químico revelaría si el compuesto químico actúa o no en esa ruta. Idealmente tales cambios se medirían en células intactas. Es decir, se tratarían células de interés con el compuesto de ensayo durante un periodo de tiempo definido y el centinela de ruta o la interacción se evaluarían en la célula intacta (viva o fijada).

Los ensayos de alto contenido son particularmente prometedores puesto que son capaces de diferenciar acontecimientos que se producen en el nivel subcelular. Las rutas se organizan con frecuencia en gran medida en el espacio subcelular, con receptores de membrana que reciben señales en la membrana plasmática y transmiten esas señales al núcleo celular, dando como resultado la activación o represión de transcripción génica. Con ensayos de alto contenido, las señales de fluorescencia en la membrana, citosol, núcleo y otros compartimentos subcelulares puede diferenciarse. Tales ensayos pueden realizarse por microscopía automática permitiendo la producción de cientos de placas microwell por día, haciendo el enfoque práctico en una escala de moderada a grande.

Con la excepción del trabajo de los inventores citado posteriormente y en las referencias del presente documento (Michnick y col.) la técnica anterior no menciona el uso de interacciones proteína-proteína para realización de perfiles farmacológicos. Además la técnica anterior no menciona el uso de ensayos de alto contenido para realización de perfiles farmacológicos y la retirada del candidato.

Están disponibles varios procedimientos para la cuantificación de interacciones proteína-proteína. Para los fines de la presente invención los inventores se han centrado en procedimientos que permiten la cuantificación y/o localización de complejos proteína-proteína en células vivas reconociendo a la vez que procedimientos adicionales, tales como polarización de fluorescencia, son adecuados para la medición de acontecimientos de unión. Los procedimientos basados en células disponibles implican ensayos fluorescentes o bioluminiscentes de interacciones proteína-proteína e incluyen transferencias de energía por resonancia (FRET o BRET), complementación de subunidad enzimática y ensayos de complementación proteína-fragmento (PCA). Se entenderá por un experto en la materia que la presente invención no se limita a la metodología de ensayo exacta que se selecciona, al procedimiento de detección o a instrumentación particular. La presente invención enseña que las interacciones proteína-proteína pueden usarse para realización de perfiles farmacológicos independientemente de la tecnología o instrumentación particular aplicados siempre que la tecnología sea suficientemente sensible y robusta para los fines del ensayo.

Los ensayos de interacción proteína-proteína basados en células fluorescentes más extendidos se basan en el fenómeno de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (FRET). En un ensayo de FRET los genes de dos indicadores fluorescentes diferentes, capaces de experimentar FRET se fusionaron de forma separada con genes codificantes de interés, y las proteínas de fusión se co-expresan en células vivas. Cuando se forma un complejo proteico entre las proteínas de interés, los fluoróforos se acercan si las dos proteínas poseen emisión y excitación solapantes, emisión de fotones por un primer fluoróforo "donador", da como resultado la absorción eficaz de los fotones emitidos por el segundo fluoróforo "aceptor". El par de FRET fluoresce con una combinación única de longitudes de onda de excitación y emisión que pueden distinguirse de las de cada fluoróforo por sí sólo en células vivas. Como ejemplos específicos, se ha usado una diversidad de mutantes GFP en ensayos de FRET, incluyendo proteínas fluorescentes cian, citrina, verde potenciada y azul potenciada. Con BRET se usa una proteína luminiscente, por ejemplo la enzima luciferasa de *Renilla* (RLuc), como un donador y una proteína verde fluorescente (GFP) se usa como una molécula aceptora. Tras la adición de un compuesto que actúa como el sustrato para RLuc, la señal de FRET se mide comparando la cantidad de luz azul emitida por RLuc con la cantidad de luz verde emitida por GFP. La relación de verde y azul aumenta a medida que las dos proteínas se acercan. Se están desarrollando nuevos procedimientos para permitir la deconvolución de FRET de calado y de autofluorescencia. Además, la microscopía de captura de imágenes de tiempo de vida de fluorescencia (FLIM) elimina muchos de los artefactos asociados con la cuantificación de intensidad de FRET simple.

Se han construido diversos ensayos basándose en la actividad de beta-galactosidasa de tipo silvestre o en el fenómeno de complementación alfa u omega. Beta-gal es una enzima multimérica que forma tetrámeros y complejos octoméricos de hasta 1 millón de Dalton. Las subunidades de Beta-gal experimentan auto-oligomerización que conduce a actividad. Este fenómeno de origen natural se ha usado para desarrollar una diversidad de ensayos homogéneos *in vitro* que son el objeto de más de 30 patentes. La complementación alfa u omega de beta-gal que se presentó por primera vez en 1965, se ha usado para desarrollar ensayos para la detección de interacciones

anticuerpo-antígeno, fármaco-proteína, proteína-proteína y otras biomoleculares. La actividad de fondo debido a la auto-oligomerización se ha superado en parte por el desarrollo de subunidades mutantes de baja afinidad con una capacidad reducida o insignificante para complementar de forma natural, lo que permite diversos ensayos incluyendo por ejemplo la detección de actividad dependiente de ligando del receptor EGF en células vivas.

5 PCA representa un procedimiento particularmente útil para mediciones de la asociación, disociación o localización de complejos proteína-proteína dentro de la célula. PCA permite la determinación y cuantificación de la cantidad y localización subcelular de complejos proteína-proteína en células vivas. Con PCA, las proteínas se expresan como fusiones con fragmentos polipeptídicos obtenidos por ingeniería genética, en los que los fragmentos polipeptídicos en sí mismos (a) no son restos fluorescentes o luminiscentes; (b) no son de origen natural; y (c) se generan por fragmentación de un indicador. Michnick y col. (documento US 6.270.964) enseñaron que cualquier proteína indicadora de interés puede usarse para PCA, incluyendo cualquiera de los indicadores descritos anteriormente. Por lo tanto, los indicadores adecuados para PCA incluyen, pero sin limitación cualquiera de varias enzimas y proteínas fluorescentes, luminiscentes o fosforescentes. Se prefieren proteínas monoméricas pequeñas para PCA, incluyendo enzimas monoméricas y proteínas fluorescentes monoméricas, dando como resultado fragmentos pequeños (~150 aminoácidos). Puesto que puede fragmentarse cualquier proteína indicadora usando los principios establecidos por Michnick y col., pueden adaptarse ensayos a las demandas particulares del tipo celular, diana, proceso de señalización e instrumentación de elección. Finalmente, la capacidad de elegir entre una amplia serie de fragmentos indicadores permite la construcción de señales fluorescentes, luminiscentes, fosforescentes o detectables de otro modo; y la selección de formatos de ensayo de alto contenido o alto rendimiento, permitiendo diversos ensayos incluyendo por ejemplo la detección de activación dependiente de ligando del receptor de eritropoyetina en células vivas.

Se han usado ensayos fluorescentes de interacciones proteína-proteína de forma individual para detectar efectos farmacológicos en las dianas individuales, incluyendo receptores y otras dianas intracelulares. Por ejemplo, los inventores han usado PCA para construir ensayos de exploración de alto rendimiento fluorescentes basados en células basándose en el complejo NFKappaB (p65/p50) (Yu y col.). Sin embargo, la técnica anterior no menciona el uso de paneles de tales ensayos para realización de perfiles farmacológicos.

En el proceso de realización de la presente invención los inventores ensayaron tres hipótesis. La primera hipótesis fue que los ensayos de alto contenido, y en particular mediciones dinámicas cuantitativas de complejos proteína-proteína específicos dentro de rutas específicas permitirían una evaluación de la activación e inhibición de esas rutas por un compuesto químico o agente. La segunda hipótesis fue que podrían producirse dos tipos acontecimientos dinámicos en respuesta a la activación de ruta: un aumento o reducción de la cantidad de un complejo específico y/o la translocación de un complejo proteína-proteína particular de un compartimento subcelular a otro. La tercera hipótesis fue que la cuantificación y localización de un número y diversidad de complejos proteicos distintos dentro de las células vivas permitirían la realización de un perfil farmacológico a una escala global, en toda la célula.

Al realizar la presente invención, se usaron ensayos basados en células para controlar la asociación y disociación dinámica de proteínas en ausencia o presencia de compuestos químicos. Aunque cualquiera de los procedimientos fluorescentes o luminiscentes anteriormente mencionados es adecuado para su uso junto con la presente invención, los inventores eligieron usar una estrategia de ensayo de complementación de fragmento-proteína (PCA). Los inventores crearon paneles de ensayos fluorescentes cuantitativos para interacciones proteína-proteína distintas en células vivas y ensayaron las actividades de más de 100 fármacos conocidos frente a los paneles de ensayo. Los inventores demuestran que el patrón de respuestas o "perfiles farmacológicos" detectados por los cambios de intensidad y/o localización física del par de centinelas está relacionado con el mecanismo de acción, especificidad y efectos fuera de ruta del fármaco que se ensaya.

#### 45 **Objetos y ventajas de la invención**

Es objeto de la presente invención permitir la retirada de candidatos farmacológicos con efectos tóxicos o no deseables.

Está relacionado con ello el establecimiento de perfiles de seguridad pre-clínicos para nuevos candidatos farmacológicos, para mejorar la eficacia del descubrimiento de fármacos identificando efectos adversos, tóxicos u otros fuera de ruta antes de ensayos clínicos para mejorar la seguridad de fármacos de primera categoría identificando efectos adversos, tóxicos u otros fuera de ruta antes de los ensayos clínicos, para proporcionar procedimientos adecuados para el desarrollo de "fármacos de diseño" con propiedades para pre-determinadas para permitir la identificación de nuevas indicaciones terapéuticas para fármacos conocidos, para permitir la identificación de las rutas bioquímicas que subyacen en la toxicidad farmacológica, o para permitir la identificación de las rutas bioquímicas que subyacen en la eficacia farmacológica para una amplia serie de enfermedades.

La presente invención tiene la ventaja de ser ampliamente aplicable a cualquier ruta, gen, biblioteca génica, clase de diana farmacológica, proteína indicadora, modo de detección, producto sintético o natural, entidad química, formato de ensayo, instrumentación automática o tipo celular de interés.

**Sumario de la invención**

- La presente invención busca satisfacer las necesidades anteriormente mencionadas de descubrimiento farmacéutico. La presente invención enseña que pueden usarse ensayos basados en células para identificar el mecanismo de acción, selectividad y efectos adversos o fuera de ruta de agentes farmacológicamente activos. La presente invención proporciona una estrategia general para llevar a cabo análisis farmacológico y realización de perfiles farmacológicos con ensayos basados en células, en particular ensayos de interacción proteína-proteína. Además, la presente invención proporciona una amplia serie de procedimientos útiles y composiciones para cumplir estos objetivos.
- Las respuestas celulares están mediadas por una compleja red de proteínas que residen dentro de los compartimentos subcelulares. La proliferación celular, muerte celular (apoptosis), quimiotaxis, metástasis, etc., se controlan todas al nivel de las proteínas que participan en interacciones proteína-proteína. El objeto de la presente invención es una metodología que permita el análisis cuantitativo de los efectos de compuestos químicos en las redes bioquímicas. La presente invención permite un análisis de los efectos de cualquier compuesto químico independientemente de la clase de fármaco o la clase de diana.
- La nueva metodología de la presente invención permite: (1) Visualización directa de la arquitectura molecular de respuestas celulares específicas al nivel de las interacciones proteína-proteína discretas que permiten dicha arquitectura celular; (2) Análisis directo y cuantitativo de efectos farmacológicos en redes de señalización celular de una manera nunca antes posible; y (3) La creación de perfiles farmacológicos cuantitativos y predictivos de compuestos candidatos y fármacos independientemente de su mecanismo de acción.
- Una realización preferida de la invención usa un gen o genes que codifican proteínas específicas de interés; preferentemente como ADNc de longitud completa caracterizados. La metodología no se limita, sin embargo, a clones de longitud completa puesto que también pueden emplearse ADNc parciales o dominios proteicos. Los ADNc, marcados con un indicador o fragmento de indicador que permiten la medición de una interacción proteína-proteína se insertan en un vector de expresión adecuado y las proteínas de fusión se expresan en una célula de interés. Sin embargo, pueden usarse genes celulares endógenos marcando el genoma con indicadores o fragmentos de indicadores, por ejemplo por recombinación no homóloga. En el último caso, las proteínas nativas se expresan junto con los marcadores indicadores seleccionados permitiendo la detección de complejos proteína-proteína nativos.
- El procedimiento requiere un procedimiento para medir interacciones proteína-proteína y/o un procedimiento de ensayo de alto contenido equivalente para un centinela de ruta. En una realización preferida, se miden interacciones proteicas dentro de una célula. Tales procedimientos pueden incluir pero sin limitación, FRET, BRET, procedimientos de dos híbridos o tres híbridos, procedimientos de complementación de subunidad enzimática y complementación proteína-fragmento (PCA). En realizaciones alternativas, las interacciones se miden en secciones tisulares, lisados celulares o extractos celulares o extractos biológicos. En los últimos casos, puede emplearse una amplia diversidad de procedimientos analíticos para la medición de complejos proteína-proteína, por ejemplo, inmunohistoquímica, transferencia de western, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel bidimensional; espectroscopia de masas; unión de ligando; puntos cuánticos u otras sondas; u otros procedimientos bioquímicos para cuantificar los complejos proteína-proteína específicos. Tales procedimientos se conocen bien por los expertos en la materia. Debería enfatizarse que no es necesario aplicar una tecnología sencilla a la medición de las diferentes interacciones proteína-proteína. Puede combinarse cualquier variedad o tipo de ensayos cuantitativos para su uso con la presente invención.
- Son realizaciones preferidas para la presente invención los procedimientos de complementación de fragmentos enzimáticos y complementación de fragmentos proteicos. Estos procedimientos permiten la cuantificación y localización subcelular de complejos proteína-proteína en células vivas.
- Con la complementación de fragmentos enzimáticos, las proteínas se expresan como fusiones con subunidades enzimáticas tales como las subunidades de origen natural o mutantes alfa/beta de beta-galactosidasa. Con PCA, las proteínas se expresan como fusiones con fragmentos polipeptídicos sintéticos, en los que los fragmentos polipeptídicos en sí mismos (a) no son restos fluorescentes o luminiscentes; (b) no son de origen natural; y (c) se generan por fragmentación de un indicador. Michnick y col. (documento US 6.270.964) enseñaron que cualquier proteína indicadora de interés puede usarse en PCA, incluyendo cualquiera de los indicadores descritos anteriormente. Por lo tanto, los indicadores adecuados para PCA incluyen, pero sin limitación, cualquiera de varias enzimas y proteínas fluorescentes, luminiscentes o fosforescentes. Se prefieren proteínas monoméricas pequeñas para PCA incluyendo enzimas monoméricas y proteínas fluorescentes monoméricas, lo que da como resultado fragmentos pequeños (~150 aminoácidos). Puesto que cualquier proteína indicadora puede fragmentarse usando los principios establecidos por Michnick y col., pueden adaptarse ensayos a las necesidades particulares del tipo celular, diana, procedimiento de señalización e instrumentalización de elección. Finalmente, la capacidad de elegir entre una amplia serie de fragmentos indicadores permite la construcción de señales fluorescentes, luminiscentes, fosforescentes o detectables de otro modo; y la selección de formatos de ensayo de alto contenido o alto rendimiento.

Como se ha mostrado anteriormente, los fragmentos polipeptídicos obtenidos por ingeniería genética para PCA no son individualmente fluorescentes o luminiscentes. Esta característica de PCA lo distingue de otras invenciones que implican marcaje de proteínas con moléculas fluorescentes o luminóforos, tales como el documento US 6.518.021 (Thastrup y col.) en los que las proteínas se marcan con GFP u otros luminóforos. Un fragmento de PCA no es un luminóforo y no permite el control de la redistribución de una proteína individual. Por el contrario, lo que se mide con PCA es la de formación de un complejo entre dos proteínas.

La presente invención no se limita al tipo de célula, fluido biológico o extracto seleccionado para el análisis. El tipo celular puede ser una célula de mamífero, célula humana, bacteria, levadura, hongo o cualquier otro tipo celular de interés. La célula también puede ser una línea celular, o una célula primaria, tal como un hepatocito. La célula puede ser un componente de un tejido intacto o animal, o en el cuerpo completo, tal como en un explante o xenotransplante; o puede aislarse de un fluido u órgano biológico. Por ejemplo, la presente invención puede usarse en bacterias para identificar agentes antibacterianos que bloquean rutas clave; en células fúngicas para identificar agentes antifúngicos que bloquean rutas clave, la presente invención puede usarse en células de mamífero o humanas para identificar agentes que bloquean rutas relacionadas con enfermedad y no tienen efectos adversos o fuera de ruta. La presente invención puede usarse junto con descubrimiento de fármacos para cualquier enfermedad de interés incluyendo cáncer, diabetes, enfermedad cardiovascular, inflamación, enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades crónicas o agudas que aquejan al ser humano.

La presente invención puede usarse en células vivas o tejidos en cualquier medio, contexto o sistema. Esto incluye células en cultivo, órganos en cultivo, y en organismos vivos. Por ejemplo, la presente invención puede usarse en organismos modelo tales como Drosófila o pez cebra. La presente invención también puede usarse en ratones desnudos, por ejemplo, células humanas que expresan proteínas marcadas, tales como con "PCA dentro", pueden tratarse como xenotransplantes en ratones desnudos y administrarse un fármaco u otro compuesto al ratón. Las células pueden después volver a extraerse del implante o pueden tomarse imágenes del ratón completo usando sistemas de captura de imágenes de animal vivo tales como los proporcionados por Xenogen (Alameda, California). Además, la presente invención puede usarse en animales transgénicos en los que las fusiones de proteínas que representan las interacciones proteína-proteína para analizar residen en el genoma del animal transgénico.

Puede analizarse cualquier tipo de compuesto químico con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Tales compuestos incluyen moléculas sintéticas, productos naturales, bibliotecas combinatorias, fármacos conocidos o potenciales, ligandos, anticuerpos, péptidos, ARN pequeños de interferencia (ARNpi), o cualquier otro agente químico cuya actividad se desee ensayar. Puede usarse aciertos de exploración de campañas exploración de biblioteca combinatoria u otras de exploración de alto rendimiento junto con la presente invención. La invención puede usarse para identificar los compuestos con propiedades más deseables en comparación con los compuestos con propiedades menos deseables. Por lo tanto la presente invención es adecuada para su uso en optimización y/o retirada de compuestos candidatos con atributos inesperados, indeseables o tóxicos.

La realización preferida es un formato de ensayo de alto contenido. En el caso de un aumento o reducción de la cantidad de un complejo proteína-proteína en respuesta a un agente químico, puede cuantificarse la señal fluorescente o luminiscente en bruto. En el caso de un desplazamiento en la localización subcelular de un complejo proteína-proteína en respuesta a fármaco, se toman imágenes de células individuales y se detecta la señal que surge del complejo proteína-proteína y su localización subcelular. Se proporcionan en el presente documento múltiples ejemplos de estos acontecimientos. Algunos procedimientos e indicadores estarán mejor adaptados a diferentes situaciones. Con PCA, una selección de indicadores permite la cuantificación y localización de complejos proteína-proteína. Los indicadores particulares pueden ser más o menos óptimos para diferentes tipos celulares y para diferentes complejos proteína-proteína.

Un experto en la materia se dará cuenta que, en muchos casos, la cantidad de un complejo proteína-proteína aumentará o se reducirá como consecuencia de un aumento o reducción de las cantidades de las proteínas individuales en el complejo. De forma similar, la localización subcelular de un complejo proteína-proteína puede cambiar como consecuencia de un desplazamiento de la localización subcelular de las proteínas individuales en el complejo. En tales casos, el complejo o los componentes individuales del complejo pueden evaluarse y los resultados serán equivalentes. Pueden construirse ensayos de alto contenido para centinelas de ruta individual (proteínas) marcando las proteínas con un fluoróforo o un luminóforo, tal como un proteína verde fluorescente (GFP) que está ligada operativamente con la proteína de interés; o por procedimientos de auto-marcaje más nuevos que incluyen marcadores SNAP y marcadores Halo (Invitrogen, BioRad); o aplicando procedimientos de inmunofluorescencia, que se conocen bien por los expertos en la materia de biología celular, usando anticuerpos específicos de proteína o específicos de modificación proporcionados por Cell Signaling Technologies, Becton Dickinson, y muchos otros proveedores. Tales procedimientos y reactivos pueden usarse junto con las interacciones proteína-proteína proporcionadas en el presente documento. En particular, pueden usarse proteínas individuales, incluyendo las enumeradas en las Tablas 1-2, para construir ensayos de alto contenido para realización de perfiles farmacológicos de acuerdo con la presente invención.

También se proporcionan en el presente documento estrategias y procedimientos para detectar los efectos de compuestos de ensayo en rutas modulables en células. La estrategia de modulación de ruta puede aplicarse a realización de perfiles farmacológicos junto con cualquier tipo celular y con cualquier parámetro medible o formato

de ensayo. Mientras que los compuestos de ensayo pueden no tener efecto significativo en condiciones basales, sus efectos pueden detectarse tratando una célula con el compuesto de ensayo y después con un modulador de ruta. Esta estrategia mejora la sensibilidad de la invención. Por ejemplo, en algunos casos un compuesto de ensayo puede no tener efectos en condiciones basales, pero puede tener un efecto pronunciado en condiciones en las que una ruta se activa o suprime. Se muestran ejemplos de la estrategia de modulación de ruta en el presente documento para rutas GPCR (+isoproterenol), rutas de citocinas (+TNF) y rutas de respuesta a daño de ADN (+camptotecina). Puede activarse o suprimirse cualquier variedad de rutas celulares por moduladores conocidos, que pueden usarse para mejorar la sensibilidad de los perfiles farmacológicos.

Los procedimientos y ensayos proporcionados en el presente documento pueden realizarse en formatos de multipocillos, en placas de microtitulación, en formatos de puntos múltiples, o en matrices, permitiendo flexibilidad en el formato del ensayo y miniaturización. Las selecciones de formatos de ensayo y modos de detección se determinan por la biología del proceso y las funciones de las proteínas dentro del complejo que se analiza. Debería observarse que en cualquiera de los casos las composiciones que son el objeto de la presente invención pueden leerse con cualquier instrumento que sea adecuado para detección de la señal que se genera por el indicador seleccionado. Las señales luminiscentes, fluorescentes o bioluminiscentes se detectan fácilmente y se cuantifican con uno cualquiera de una diversidad de sistemas de instrumentación de alto rendimiento y/o automáticos incluyendo lectores de placa multipocillo de fluorescencia, separadores de célula activados por fluorescencia (FACS) y sistemas de captura de imágenes basados en células automáticos que proporcionan resolución especial de la señal. Se ha desarrollado una diversidad de sistemas de instrumentación para automatizar HCS incluyendo los sistemas de microscopía automática y de captura de imágenes de fluorescencia automáticos desarrollados por Cellomics, Amersham, TTP, Q3DM (Beckman Coulter), Evotec, Universal Imaging (Molecular Devices) y Zeiss. También se ha usado la recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP) y microscopía de fluorescencia de lapso de tiempo para estudiar la movilidad de proteínas en células vivas. La presente invención también puede usarse junto con los procedimientos descritos en los documentos US 5.989.835 y US 6.544.790.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 ilustra el objetivo de la presente invención. Las redes bioquímicas que controlan el comportamiento celular se representan como un diagrama de circuito. Los fármacos y compuestos químicos tienen efectos tanto conocidos (pretendidos) como desconocidos (no pretendidos) dentro de las células. Las interacciones proteína-proteína, o complejos, representan elementos binarios dentro de las redes bioquímicas que pueden explorarse para identificar efectos conocidos o desconocidos de fármacos y compuestos candidatos.

La Figura 2 proporciona ejemplos de proteínas intracelulares que forman complejos proteína-proteína. Prácticamente cada proteína en la célula forma complejos con una o más otras proteínas u otras macromoléculas, y ejerce su actividad en el contexto de estos complejos macromoleculares. Los ejemplos de proteínas que forman complejos, para las que pueden construirse ensayos, incluyen receptores (de membrana, citosólicos o nucleares), canales iónicos, proteínas adaptadoras, quinasas, fosfatasa, proteasas, proteínas de unión a nucleótidos y factores de intercambio de nucleótidos, enzimas biosintéticas o catabólicas, chaperonas, factores de intercambio y proteínas de transporte, la maquinaria apoptótica, citoesquelética y de ciclo celular, armazones y proteínas estructurales, el citoesqueleto y otros elementos estructurales y factores de transcripción.

La Figura 3 muestra las redes intercelulares relacionadas con el concepto para efectos farmacológicos y para perfiles farmacológicos. (A) Las redes de señalización bioquímica están comprendidas por módulos o grupos de interacciones proteína-proteína relacionadas funcionalmente. Se representan tres módulos teóricos como diagramas de esferas y barras (Módulos A, B y C). Las esferas representan interacciones proteicas que están conectadas entre módulos por líneas. La transmisión de señal entre Módulo A y Módulo B se produce mediante el complejo sombreado en azul. Cada proteína en un complejo constituye un ensayo potencial para controlar la actividad farmacológica corriente arriba. Los tonos de rojo y verde representan ensayos seleccionados para explorar la respuesta del módulo a fármacos A-C. Los complejos proteicos que se reducen en respuesta a un tratamiento farmacológico particular se somborean en rojo y los que aumentan la respuesta a un tratamiento farmacológico particular se somborean en verde. (B) Una matriz que representa los patrones cuantitativos resultantes de inhibición (tonos relativos de rojo) y activación (tonos relativos de verde) para diversos fármacos (en el eje x) frente a ensayos individuales (en el eje y). Los fármacos en la categoría A ( $D_A$ ) tienen un efecto inhibitorio en el módulo A que se transmite al módulo B. Por lo tanto los cuatro ensayos que representan módulo A así como los que representan el módulo B, redujeron la actividad. Los fármacos en la categoría B ( $D_B$ ) tienen un efecto inhibitorio en los ensayos de módulo B solamente, mientras que los fármacos de la categoría C ( $D_C$ ) tienen un efecto estimulador en los ensayos de módulo C solamente.

La Figura 4 representa las etapas básicas en la realización de perfiles farmacológicos.

La Figura 5 muestra un sistema de alto rendimiento para realización de perfiles farmacológicos. El procedimiento completo puede automatizarse en formatos de placas de microtitulación o matrices.

Los fármacos pueden analizarse en diferentes puntos temporales después de su adición a células, para obtener estudio de las dinámicas de acción farmacológicas. Las imágenes se convierten a resultados numéricos y los datos numéricos pueden almacenarse en una base de datos relacional y analizarse por cualquier variedad de rutinas gráficas, numéricas o estadísticas.

La Figura 6A es un esquema publicado de rutas de GPCR. Los receptores acoplados a proteína G y sus interactores corriente abajo forman complejos proteína-proteína que pueden explorarse en células intactas.

La Figura 6B muestra ejemplos de complejos proteicos en rutas de GPCR en células humanas intactas como se evalúa por PCA. La señal de fluorescencia refleja la cantidad y localización subcelular de cada complejo proteína-proteína (verde); los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Refiérase a las Tablas 1-3 y el protocolo experimental para detalles del ensayo mostrado aquí. Tales ensayos pueden usarse en la realización de perfiles farmacológicos.

La Figura 7A es un esquema publicado de interacciones en las rutas de ubiquitina-proteasoma y ciclo celular. Tales rutas pueden explorarse con interacciones proteína-proteína.

La Figura 7B muestra ejemplos de complejos proteicos en la ruta de ubiquitilación, sumoilación y/o proteasoma. Se muestran interacciones directas de proteínas con ubiquitina o SUMO, así como interacciones de ligasas de E3 y SUMO con sustratos como se evalúa por PCA. Tales ensayos pueden usarse para detectar los efectos de compuestos químicos en estas rutas y pueden construirse para muchas otras proteínas.

La Figura 7C muestra que el inhibidor de proteasoma, ALLN, provoca la acumulación de complejos proteína-proteína que se sabe que están controlados por el proteasoma; este efecto de ALLN es por lo tanto un efecto esperado o "en ruta" del agente. Los agentes que inhiben, activan o potencian estas rutas pueden identificarse con estos ensayos.

La Figura 8A es un esquema publicado de interacciones en rutas de señalización, incluyendo interacciones de diversas quinasas con otras proteínas.

La Figura 8B muestra ejemplos de interacciones entre quinasas y otras proteínas en células intactas como se evalúa por PCA. Tales ensayos pueden construirse para muchas otras quinasas y proteínas de señalización y pueden usarse para detectar los efectos de compuestos químicos nuevos o conocidos en estas rutas.

La Figura 8C muestra efectos esperados de inhibidores de quinasa "corriente arriba" o complejos "corriente abajo". Wortmanina y Ly294002 son inhibidores de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) que está corriente arriba de PDK1 y AKT1. AKT1 es un sustrato de PDK1 y forma un complejo con PDK1. El tratamiento celular con inhibidores de PI3K da como resultado pérdida de PDK1/AKT1 en la membrana celular y una relocalización del complejo al citosol, como se muestra en las imágenes. Se producen cambios en un periodo de minutos desde la adición del fármaco; se tomaron imágenes a los 90 minutos. Las expresiones "corriente arriba" y "corriente abajo" se usan habitualmente para referirse a cascadas de señalización, en las que se producen acontecimientos en una secuencia temporal, precediendo un acontecimiento "corriente arriba" a un acontecimiento "corriente abajo".

La Figura 8D muestra los efectos de dos inhibidores de quinasa no selectivos diferentes, indirubina-3'-monoxima y BAY11-7082, en complejos Ras/Raf-1 en células HEK293. El número de complejos se reduce en un periodo de minutos desde el tratamiento farmacológico; las imágenes se tomaron a los 30 minutos.

La Figura 9A es un esquema publicado de interacciones seleccionadas de chaperonas y co-chaperonas entre sí y con proteínas cliente.

La Figura 9B muestra que el tratamiento de células con los inhibidores de HSP conocidos, geldanamicina o 17-alilamino-geldanamicina (17-AAG) provoca una pérdida de complejos cliente-proteína. Akt1 es una proteína cliente para HSP90. Se muestran efectos para Akt1/p27. Tales ensayos pueden usarse para evaluar los efectos de compuestos nuevos o conocidos en estas dianas y rutas.

La Figura 10A es un esquema publicado de interacciones que implican receptores de hormonas nucleares. El agonista, rosiglitazona, induce la formación de complejos entre su receptor, PPARgamma, y un coactivador nuclear, en este caso RXRalfa.

La Figura 10B muestra ejemplos de varias interacciones que implican receptores de hormonas nucleares. Como en los otros ejemplos mostrados en el presente documento, se construyeron ensayos usando PCA. Tales interacciones proteína-proteína pueden usarse para evaluar los efectos de compuestos conocidos o nuevos en estas rutas.

La Figura 11A muestra un esquema publicado de interacciones en la ruta mitocondrial de la apoptosis. Las microfotografías muestran la interacción real de Bad/Bcl-xL en la mitocondria; la señal de PCA (verde) se localiza con una tinción mitocondrial (rojo) lo que demuestra que los complejos proteicos se localizan correctamente en la mitocondria.

La Figura 11B muestra los efectos dinámicos de estaurosporina, un agente inductor de apoptosis, en cuatro interacciones proteicas diferentes. Las microfotografías de fluorescencia muestran la localización e intensidad de los complejos y los histogramas muestran la cuantificación de la señal basada en análisis de imagen cuantitativa. Tales interacciones proteína-proteína pueden usarse para evaluar los efectos de compuestos nuevos o conocidos en estas rutas.

La Figura 12 (A-D) muestra imágenes de diferentes interacciones proteína-proteína con efectos farmacológicos representativos. Los detalles de las proteínas y fármacos usados están en la Tabla 1 y Tabla 4, respectivamente. Se muestran imágenes de fluorescencia de Hoechst (azul) e YFP (verde) (objetivo 40X). Para cada columna, el panel del lado izquierdo muestra el control (vehículo solamente) y nombra el complejo en texto blanco, y el panel del lado derecho muestra el efecto de fármaco/tiempo. Antes de la terminación del ensayo, los ensayos marcados "+CPT" se estimularon con camptotecina 500 nM durante 960 minutos, el ensayo marcado con "+ISO" se estimuló con isoproterenol 2 micromolar durante 30 minutos, y el ensayo marcado con "+TNFalfa" se estimuló con TNFalfa humano 50 ng/ml durante 20 minutos. El ensayo p50:p65 se muestra sin las imágenes de Hoechst nucleares para permitir la visualización de efectos farmacológicos en la localización subcelular del complejo. El uso de camptotecina, isoproterenol y TNFalfa para inducir rutas



particulares es un ejemplo de la estrategia de modulación de ruta proporcionada en la presente invención.

La Figura 13A muestra ejemplos de efectos farmacológicos cuantitativos en interacciones proteína-proteína. Se ensayaron 17 fármacos diferentes frente a cuatro interacciones proteína-proteína distintas en múltiples puntos temporales. Se muestran microfotografías representativas, que muestran localización subcelular de complejos proteína-proteína fluorescentes, a la izquierda. Los histogramas revelan los resultados cuantitativos de los efectos farmacológicos vistos en las imágenes que están marcadas con asteriscos.

La Figura 13B muestra ejemplos de efectos farmacológicos en interacciones proteína-proteína. Se ensayaron 17 fármacos diferentes frente a cuatro interacciones proteína-proteína distintas en múltiples puntos temporales. Se muestran microfotografías representativas, que muestra la localización subcelular de complejos proteína-proteína fluorescentes, a la izquierda. Los histogramas muestran los resultados cuantitativos de los efectos farmacológicos (con asterisco).

La Figura 14A ilustra la estrategia de modulación de ruta para realización de perfiles farmacológicos. Las células se tratan con un compuesto de ensayo seguido un modulador de ruta de cualquier tipo o composición química. Con esta estrategia, pueden detectarse compuestos de ensayo o bloquean los efectos del modulador en las rutas celulares.

La Figura 14B muestra la utilidad de la estrategia de modulación de ruta para realización de perfiles farmacológicos. Se usó camptotecina para inducir daño de ADN, que conduce a la activación de las rutas de respuesta a daño de ADN, como se muestra para Chk1/Cdc25C. Pueden identificarse después agentes que potencian o bloquean los efectos de camptotecina, como se muestra en la matriz. Puede tomarse una estrategia de ensayo similar con cualquier ruta celular y con cualquier modulador de ruta.

La Figura 15A muestra activación de una ruta de GPCR por su agonista conocido e inhibición por antagonista. El isoproterenol indujo la formación de complejos entre el receptor beta-adrenérgico (un GPCR) y beta-arrestina. El pretratamiento con propanolol bloqueó el efecto de isoproterenol. Por lo tanto, en ausencia de isoproterenol, pueden detectarse activadores de ruta; mientras que en presencia de isoproterenol pueden detectarse antagonistas o inhibidores de ruta. Puede aplicarse una estrategia similar a cualquier receptor celular incluyendo GPCR, receptores de membrana y receptores nucleares.

La Figura 15B un efecto "fuera de ruta" no pretendido o no deseable de un compuesto candidato en una ruta de GPCR. El compuesto era un inhibidor de quinasa patentado, selectivo y potente con actividad antiproliferativa, que se pretendía para el tratamiento de cáncer y no se pretendía o esperaba que tuviera actividad en rutas de GPCR. El efecto del agente se observó en presencia de isoproterenol, lo que ejemplifica la utilidad de la estrategia de modulación de rutas. Puesto que el agente no se une directamente con el GPCR, este efecto no pretendido podría ser el resultado de inhibición de una GRK (quinasa receptora de proteína G) u otra proteína reguladora en esta ruta. Puesto que los GPCR regulan la función cardiovascular, esta actividad "fuera de ruta" es indeseable y este resultado de ensayo permitió la retirada de este compuesto. Otros compuestos candidatos dentro de la misma serie química no mostraron esta actividad y pudieron por lo tanto investigarse.

La Figura 16A muestra que puede detectarse toxicidad basada en mecanismo en ensayos basados en células. Los efectos pronunciados de una sustancia tóxica conocida, cloruro de cadmio (10 micromolar) en cuatro interacciones proteicas diferentes en células humanas se muestran en las imágenes e histogramas. Se toman imágenes 8 horas después del tratamiento celular con cloruro de cadmio.

Figura 16B con el uso de ensayos para interacciones proteicas, el perfil de actividad de cualquier agente nuevo puede compararse con el perfil de una sustancia tóxica conocida, tal como cloruro de cadmio, para determinar si el nuevo agente tiene actividad celular similar a la de la sustancia tóxica. En el ejemplo mostrado, se procesaron cuatro ensayos diferentes en paralelo. El verde indica un aumento del parámetro del ensayo y el rojo indica una reducción. En los perfiles mostrados, dos compuestos patentados (candidato 101 y 102) tuvieron perfiles similares a los del cadmio y se documentó posteriormente que producían toxicidad hepática en roedores. Otros compuestos candidatos de esta serie no compartían este perfil tóxico.

Figura 17A las actividades de 107 fármacos conocidos diferentes se evaluaron frente a un panel de 53 interacciones proteicas diferentes, ensayándose cada interacción en uno o más puntos temporales en células HEK293 con PCA. El resultado de cada ensayo se codificó como sin efecto (negro), señal de ensayo aumentada (verde) o señal de ensayo reducida (rojo). En la matriz resultante, los fármacos están en el eje x y los ensayos están en el eje y. Cada fármaco dio una identificación farmacológica característica (perfil). Los resultados numéricos del ensayo de cada combinación de ensayo/tiempo/pretratamiento se agruparon como se describe en el protocolo experimental, para evaluar similitudes y diferencias entre fármacos basándose en sus perfiles de actividad.

Figura 17B las agrupaciones de fármacos del eje x de la Figura 17A se muestran en el presente documento con nombres de fármacos unidos al dendrograma. Los fármacos conocidos se agruparon basándose en sus actividades de rutas similares, validando que la estrategia captura fielmente las actividades en ruta a gran escala. También se observaron diferencias en la selectividad (actividad fuera de ruta) entre compuestos cercanamente relacionados, lo que remarca la capacidad de la estrategia para capturar actividades fuera de ruta de una amplia serie de compuestos químicos y dianas.

La Figura 18 es una matriz que muestra los perfiles de candidatos farmacológicos, que representan varias clases diana de fármacos diferentes, en un panel de ensayos de diferentes interacciones proteicas. La codificación por colores fue como en la Figura 16A. Los fármacos que eran no selectivos pudieron distinguirse fácilmente de los que eran más selectivos en el panel de ensayo. Dos compuestos que demostraron ser hepatotóxicos mostraron actividad extensiva fuera de ruta que sugería una falta general de selectividad en células humanas. Por lo tanto, pueden usarse ensayos de interacciones proteicas por etapas durante la

optimización del candidato para desarrollar candidatos que sean “más limpios” (más selectivos) en células humanas. En el ejemplo mostrado, cada candidato farmacológico se ensayó a una concentración que era 3x su CI50 celular; también pueden usarse curvas de respuesta a dosis para comparar potencias a lo largo de cualquier panel de ensayo.

## 5 **Descripción detallada de la invención**

### **Identificación de efectos en ruta y fuera de ruta de los fármacos (realización de perfiles farmacológicos)**

10 Todos los fármacos ejercen sus efectos actuando en proteínas dentro de células vivas. El procedimiento típico de descubrimiento de fármacos implica seleccionar una diana proteica y establecer un ensayo *in vitro* para esa diana de interés. La fase de selección de diana de descubrimiento se sigue de identificación, exploración o desarrollo de un compuesto químico que ejerza el efecto deseado en esa diana. Esto se consigue por exploración de alto rendimiento de un compuesto químico u otra biblioteca de compuestos; por cristalización de la diana y procedimientos *in silico* o húmedos para diseñar un compuesto que se ajusta a un sitio de unión en una diana; o por una combinación de estos y procedimientos similares. Independientemente del procedimiento usado, siempre hay una diana, actividad o efecto conocido del compuesto. Sin embargo, en casi todos los casos, los fármacos y candidatos a fármaco ejercen efectos desconocidos cuando entra en contacto con células vivas. Tales efectos desconocidos son resultado de la falta de especificidad de la molécula en el contexto de las miles de proteínas que componen el medio bioquímico de la célula viva. En algunos casos, estos efectos desconocidos pueden dar como resultado consecuencias biológicas adversas o toxicidad que no se ve hasta que el fármaco no se administra a cientos o miles de pacientes.

20 El desafío central de la industria farmacéutica es desarrollar fármacos que sean tanto seguros como eficaces en el hombre. El equilibrio entre seguridad y eficacia es habitualmente difícil de conseguir como se demuestra por el 75 % de tasa de fracaso de los fármacos en pruebas clínicas. Con frecuencia, un fármaco es completamente seguro pero tiene eficacia insuficiente en una condición particular para proporcionar cualquier beneficio apreciable a la población de pacientes para la que se pretende. En otros casos, un fármaco es eficaz pero tiene efectos adversos a largo plazo que no son evidentes hasta que se ha estudiado un gran número de pacientes durante largos periodos de tiempo. Las toxicidades agudas y crónicas pueden conducir a retirada de un fármaco del mercado, y existen numerosos ejemplos tales que incluyen troglitazona (Rezulin) y otros fármacos. Por lo tanto, la industria farmacéutica emplea investigación sustancial y dinero de desarrollo en un intento de entender la selectividad y potenciales efectos adversos de los fármacos, antes de los ensayos clínicos. Sin embargo, los procedimientos actuales para realizar los perfiles de selectividad de los fármacos son extremadamente limitados. Por lo tanto los inventores buscan un procedimiento para permitir la rápida identificación de efectos en ruta y fuera de ruta de los fármacos a una escala genómica.

### **Ejemplos de proteínas intracelulares que forman complejos**

35 Se cree que cada proteína de la célula entra en contacto con numerosas otras proteínas. Además se cree que existen muchas rutas en la célula, que representan colecciones organizadas de proteínas que actúan en concierto para responder a condiciones o para ejercer un fenotipo celular particular. La Figura 2 proporciona ejemplos de las clases de proteínas que participan en interacciones proteína-proteína. Algunas de estas interacciones intracelulares proteína-proteína son constitutivas, es decir, no responden a estímulos externos, condiciones ambientales u otros moduladores. Por “responder” los inventores entienden que una interacción proteína-proteína particular aumenta, disminuye o experimenta un cambio en distribución subcelular o patrón en respuesta a una perturbación. Sin embargo, muchas, si no la mayoría, de las interacciones están moduladas en ciertas condiciones en células vivas. Por ejemplo, ciertas interacciones proteína-proteína se inducen por unión de un agonista, hormona o factor de crecimiento con un receptor que induce una cascada de señalización o por una molécula pequeña que activa una proteína intracelular o enzima. Otras interacciones pueden inhibirse, por ejemplo mediante unión de un antagonista o un anticuerpo con un receptor bloqueando de este modo una cascada de señalización; por un ARNpi, que silencia un gen que codifica una proteína que es crítica para una ruta; o por un fármaco que inhibe una proteína particular dentro de una ruta. Estos ejemplos pretenden ilustrar la amplitud de la invención y no son limitantes para la práctica de la invención.

### **Procedimiento para realización de perfiles farmacológicos**

Se muestra una visión de conjunto del procedimiento de análisis farmacológico en la Figura 4.

50 La Etapa 1 implica seleccionar los compuestos químicos, candidatos farmacológicos o fármacos cuyo perfil va a realizarse.

La Etapa 2 implica seleccionar las interacciones proteína-proteína para ensayar. Estas pueden ser proteínas de interacción nuevas o conocidas. Las proteínas de interacción pueden identificarse, o seleccionarse, racionalmente, por ejemplo, mediante el conocimiento previo de una ruta o un par de proteínas de interacción, o de forma empírica. Por ejemplo, las proteínas de interacción pueden identificarse por uno o más procedimientos que incluyen exploración de cebo contra biblioteca o mapeo de interacción por pares (gen a gen). Además, puede construirse simplemente un número ilimitado de ensayos de interacción proteína-proteína de forma aleatoria y ensayarse de forma empírica con respecto a su sensibilidad a cualquier variedad de fármacos o compuestos químicos y los

resultados pueden combinarse en un perfil farmacológico. Prácticamente no existe límite de los tipos, números o identidades de las interacciones proteína-proteína que pueden usarse en la realización de perfiles farmacológicos. Probablemente hay cientos de miles de interacciones proteína-proteína que se producen en células de mamífero. Sin embargo, algunas serán constitutivas; y otras serán redundantes. Una interacción constitutiva, que no responde a fármacos, agonistas u otros compuestos perturbadores, no será útil en la realización de perfiles farmacológicos. Afortunadamente, puede determinarse empíricamente si una interacción proteína-proteína específica es útil en la realización de perfiles, simplemente construyendo un ensayo para la interacción, usando uno de los muchos tipos de ensayo analizados en el presente documento, y ensayándolo con respecto a sensibilidad frente a una serie de fármacos u otros compuestos. Una interacción redundante es una que proporciona información que no es diferente de la información proporcionada por una interacción diferente. Puesto que las interacciones entre proteínas se mapean gradualmente con el tiempo será posible construir un panel de ensayos completamente predictivos basándose en los procedimientos proporcionados en el presente documento. Un panel tal permitirá ensayar cualquier compuesto para determinar su espectro completo de actividades contra todas las rutas en la célula viva y determinar cualquier actividad fuera de ruta que sugiera consecuencias adversas.

La Etapa 3 de la realización de perfiles farmacológicos implica construir los ensayos para dos o más interacciones proteína-proteína. Los procedimientos adecuados para construir tales ensayos están muy extendidos y se han descrito en detalle en los antecedentes de la invención; tales procedimientos, que incluyen procedimientos de dos híbridos y FRET así como procedimientos de captura inmune, están bien documentados en la bibliografía y puede simplemente adaptarse para la presente invención si los pares de proteínas de interacción se seleccionan de forma apropiada y el procedimiento es suficientemente sensible para detectar y cuantificar cambios de la intensidad de señal o localización debido a los compuesto químicos o fármacos de interés.

En el caso de ensayos de complementación de fragmento, los ensayos se construyen de acuerdo con el siguiente esquema. Para estudiar la red de señalización, cada uno de los miembros de un par proteína-proteína seleccionado se clona como una fusión génica en fase (3' ó 5') con fragmentos indicadores que codifican una molécula indicadora de PCA en un vector apropiado de modo que tras la transfección en una línea celular apropiada la proteína codificada que se expresa posteriormente en la célula porta un fragmento proteico (polipéptido) en el extremo amino o carboxilo terminal de la proteína codificada en el ADNc original seleccionado. Pueden construirse ensayos usando transfecciones transitorias o líneas celulares estables o infección, tal como con retrovirus o adenovirus diseñados para expresar las proteínas de interés y para permitir detección de las interacciones de interés.

La Etapa 4 de la realización de perfiles farmacológicos, cada compuesto químico o fármaco se ensaya contra cada interacción proteína-proteína en momentos y a concentraciones farmacológicas específicas. Cada resultado farmacológico se compara con valores de control (sin tratamiento). (Pueden procesarse controles positivos y negativos para cada ensayo, en cada punto temporal y condición de estímulo). En la Etapa 5, los resultados de los ensayos se combinan para establecer un perfil farmacológico para cada compuesto. Los resultados pueden presentarse de diversas maneras. En los ejemplos proporcionados en el presente documento los inventores han usado una presentación de matriz y/o un histograma para representar los perfiles farmacológicos. En el caso de una matriz, los resultados de cada exploración pueden representarse en una matriz codificada por colores en la que el rojo indica una reducción de la intensidad de señal o localización mientras que el verde indica un aumento. Pueden usarse diferentes tonos de rojo y verde para representar la intensidad del cambio. De esta manera la presentación es similar a la de un experimento de micromatriz.

Puede usarse software adecuado para análisis de rutas para crear mapas de rutas, en los que los resultados del compuesto farmacológico se traducen en un diagrama que muestra acontecimientos corriente arriba y corriente abajo y que liga fármacos a esos acontecimientos. Se comercializa software de análisis de ruta adecuado por Ingenuity Systems, GeneGo, y muchos otros distribuidores.

#### **Protocolo experimental**

Para aplicar la presente invención a gran escala, los inventores construyeron numerosos ensayos para rutas que controlan procesos celulares clave, incluyendo apoptosis, el ciclo celular, respuesta a daño de ADN, señalización de GPCR, interacciones de chaperonas moleculares, regulación citoesquelética, degradación proteosómica, mitogénesis, inflamación y rutas de receptores de hormonas nucleares. Se seleccionaron complejos proteína-proteína para representar interacciones a diferentes niveles jerárquicos dentro de rutas bien caracterizadas. Se proporcionan ejemplos de rutas exploradas, y ejemplos de ensayos para diversas dianas, en las Figuras 7-15 de la presente invención junto con ejemplos de efectos esperados ("en ruta") e inesperados de los fármacos, sustancias tóxicas y compuestos candidatos. Los inventores abarcaron una amplia serie de rutas, proteínas, fármacos y clases de diana para destacar la universalidad del enfoque.

Se encuentran más adelante detalles de proteínas particulares que se exploraron en las Tablas 1-3. Es importante observar que la invención puede usarse con cualquier interacción proteica siempre que pueda construirse un ensayo dinámico para esa interacción. Además, pueden aplicarse elementos particulares de la invención, incluyendo la estrategia de modulación de ruta para ensayos basados en células de los inventores, a cualquier parámetro de medición de un complejo proteico o incluso una proteína individual en una célula.

Para evaluar los efectos farmacológicos en redes de transducción de señal humanas, los inventores analizaron los efectos farmacológicos con ensayos de alto contenido en una línea celular humana (células HEK293) los ensayos permiten la exploración de la actividad de nodos de señalización específicos en diferentes condiciones y puede controlarse la actividad a niveles temporales y espaciales dentro de una red de rutas. Para aplicar esta estrategia a gran escala, los inventores construyeron numerosos ensayos para rutas que controlan procesos celulares clave, incluyendo apoptosis, el ciclo celular, respuesta a daño de ADN, señalización de GPCR, interacciones de chaperonas moleculares, regulación citoesquelética, degradación proteosómica, mitogénesis, inflamación y rutas de receptores de hormonas nucleares. Analizando la respuesta de diversos nodos de señalización que representan múltiples clases de diana y rutas, los inventores pudieron precisar actividad y selectividad farmacológica en ruta y fuera de ruta, toxicidad general y basada en mecanismo y relaciones farmacológicas.

Las exploraciones de PCA emplean fragmentos complementarios (F[1] y F[2]) de una proteína indicadora que se plegará en una forma activa solamente si se fusiona con dos proteínas que interactúan. Se seleccionaron complejos proteína-proteína (Tabla 1) para representar interacciones conocidas que se producen a diferentes niveles jerárquicos dentro de rutas bien caracterizadas. Para los ejemplos, los inventores organizaron ensayos basados en fragmentos de un mutante intensamente fluorescente de YFP (Remy y Michnick, 2001; Remy y Michnick, 2004; Remy y col., 2004), que madura rápidamente (9 minutos (Nagai y col., 2002)), lo que permite la visualización, cuantificación y localización de complejos formados entre proteínas de longitud completa expresadas a niveles bajos en células humanas. El objetivo de la minimización de la expresión fue minimizar las perturbaciones potenciales de las rutas endógenas por la proteínas exógenas (Yu, 2003).

### **Síntesis de fragmentos y preparación de construcciones**

Se generaron fragmentos indicadores para PCA por síntesis de oligonucleótidos (Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). En primer lugar, se sintetizaron oligonucleótidos que codifican fragmentos polipeptídicos YFP[1] e YFP[2] (correspondientes a los aminoácidos 1-158 y 159-239 de YFP). A continuación, se usó mutagénesis por PCR para generar los fragmentos mutantes IFP[1] e IFP[2]. El fragmento de IFP[1] corresponde a YFP[1]-(F46L, F64L, M153T) y el fragmento IFP[2] corresponde a YFP[2]-(V163A, S175G). Se ha mostrado que estas mutaciones aumentan la intensidad de fluorescencia de la proteína YFP intacta (Nagai y col., 2002). Los fragmentos YFP[1], YFP[2], IFP[1] e IFP[2] se amplificaron por PCR para incorporar sitios de restricción y una secuencia de engarce, descrita posteriormente, en configuraciones que permitirían la fusión de un gen de interés con el extremo 5'- ó 3'- de cada fragmento indicador. Los casetes de fragmentos de engarce-indicador se subclonaron en un vector de expresión de mamíferos (pcDNA3.1Z, Invitrogen) que se había modificado para incorporar el origen de replicación (oriP) del virus de Epstein Barr (EBV). El oriP permite replicación episómica de estos vectores modificados en líneas celulares que expresan el gen EBNA1, tales como células HEK293E (293-EBNA, Invitrogen). Adicionalmente, estos vectores aún conservan el origen SV40, que permite la expresión episómica en líneas celulares que expresan el antígeno T grande de SV40 (por ejemplo, HEK293T, Jurkat o COS). La integridad de los fragmentos indicadores mutados y el nuevo origen de replicación se confirmaron por secuenciación.

Se prepararon construcciones de fusión de PCA para un gran número de proteínas que se sabe que participan en una diversa serie de rutas celulares (Tabla 1). La secuencia codificante completa para cada gen de interés se amplificó por PCR a partir de un ADNc de longitud completa con secuencia modificada. Los productos de PCR resultantes se purificaron en columna (Centricon), se digirieron con enzimas de restricción apropiadas para permitir la clonación direccional y se fusionaron en fase con el extremo 5' ó 3' de YFP[1], YFP[2], IFP[1] o IFP[2] a través de un engarce que codifica un péptido de 10 aminoácidos flexible (Gly.Gly.Gly.Gly.Ser)<sub>2</sub>. El engarce flexible asegura que la orientación/ordenamiento de las fusiones es óptima para poner los fragmentos indicadores en proximidad cercana (Pelletier y col., 1998). Se exploraron recombinantes en las cepas huésped DH5-alfa (Invitrogen, Carlsbad, CA) o XL1 Blue MR (Stratagene, La Jolla, CA) por PCR de colonias, y los clones que contenían insertos del tamaño correcto se sometieron a secuenciación de extremos para confirmar la presencia del gen de interés y fusión en fase con el fragmento indicador apropiado. Se seleccionó un subconjunto de construcciones de fusión para secuenciación de inserto completo por avance de cebadores. Se aislaron ADN usando kits Qiagen MaxiPrep (Qiagen, Chatsworth, CA). Se usó PCR para evaluar la integridad de cada construcción de fusión, combinando el cebador específico de gen apropiado con un cebador específico de indicador para confirmar que estaba presente la fusión génica correcta y del tamaño correcto sin delecciones internas.

Todos los fragmentos de proteínas fluorescentes mencionadas anteriormente son objeto de la Solicitud de Estados Unidos del mismo solicitante número de serie 10/724,178 presentada el 1 de diciembre de 2003.

### **Transfecciones transitorias**

Se mantuvieron células HEK293 en medio MEM alfa (Invitrogen) complementado con FBS 10 % (Gemini Bio-Products), penicilina 1 % y estreptomycin 1 % y se dejaron crecer en un incubador a 37 °C equilibrado a CO<sub>2</sub> 5 %. Aproximadamente 24 horas antes de las transfecciones las células se sembraron en placas revestidas con poli-D-Lisina de 96 pocillos (Greiner) usando un sistema de bomba peristáltica Multidrop 384 (Thermo Electron Corp., Waltham, Mass) a una densidad de 7.500 por pocillo. Hasta 100 ng de los vectores de fusión de fragmento YFP o IFP complementarios se co-transfectaron usando Fugene 6 (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La lista de los pares de PCA seleccionados explorados en este estudio, e información de fragmento indicador y gen

correspondiente, se enumeran en la Tabla 2. Después de 24 o 48 horas de expresión, las células se exploraron frente a un panel de fármacos como se describe posteriormente.

**Tabla 1. Proteínas, genes y ensayos para interacciones proteicas para la presente invención**

Nombre de Ensayo	Gen_1	Nº de acceso de Gen_1	Gen_2	Nº de acceso de Gen_2
$\alpha$ tubulina/HDAC6	TUBA2	NM_006001	HDAC6	NM_006044
$\alpha$ tubulina/ HDAC6	TUBA2	HDAC6	NM_006001	NM_006044
$\alpha$ -actina/ $\alpha$ -actinina	ACTA1	NM_001100	ACTN1	NM_001102
AKL3L/GUK1	AKL3L	NM_016282	GUK1	NM_000858
AKL3L/IPP2	AKL3L	NM_016282	PPP1R2	NM_006241
Akt1/Cdc37	AKT1	NM_005163	CDC37	NM_007065
Akt1/GSK3 $\beta$	AKT1	NM_005163	GSK3B	NM_002093
Akt1/Cdc37	AKT1	NM_005163	CDC37	NM_007065
Akt1/GSK3 $\beta$	AKT1	NM_005163	GSK3B	NM_002093
Akt1/p27	AKT1	NM_005163	CDKN1B	NM_004064
Akt1/p70S6K	AKT1	NM_005163	RPS6KB1	NM_003161
Akt1/Smad3	AKT1	NM_005163	MADH3	NM_005902
AMPK/HMGCR	PRKAA1	NM_206907	HMGCR	NM_000859
anexina I/FPRL1	ANXA1	NM_000700	FPRL1	NM_001462
ARF1/gamma-COP	ARF1	NM_001658	COPG1	NM_016128
B2AR/ $\beta$ -arrestina2	beta2AR	NM_000024	ARRB2	NM_004313
$\beta$ 2AR/Gai3	beta2AR	NM_000024	GNAI3	NM_006496
Bad/14-3-3 $\alpha$	BAD	NM_004322	SFN	NM_006142
Bad/Bd-xL	BAD	NM_004322	BCL2L1	NM_138578
Bag1/Hsp70L1	BAG1	NM_004323	HSP70L1	NM_005527
Bax/Bid	BAX	NM_138761	BID	NM_001196
Bcl-xL/Bik	BCL2L1	NM_138578	BIK	NM_001197
$\beta$ -arrestina2/Erk2	ARRB2	NM_004313	MAPK1	NM_002745
$\beta$ -arrestina2/Ub	ARRB2	NM_004313	UBB	NM_021009 (nt 69..296)
$\beta$ -catenina/CBP	CTNNB1	NM_001904	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)
$\beta$ -catenina/Pin1	CTNNB1	NM_001904	PIN1	NM_006221
$\beta$ -TrCP/ $\beta$ -catenina	BTRC	NM_033637	CTNNB1	NM_001904
$\beta$ -TrCP/ROC1	RBX1	NM_033637	BTRC	NM_014248
c-Jun/CBP	JUN	NM_002228	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)
c-Jun/Fos	JUN	NM_002228	FOS	NM_005252

ES 2 387 841 T3

(continuación)

Nombre de Ensayo	Gen _1	Nº de acceso de Gen _1	Gen _2	Nº de acceso de Gen _2
c-Src/Grk2	CSK	NM_004383	ADRBK1	NM_001619
Calcineurina A/Bad	PPP3CA	NM_005605	BAD	NM_004322
CaM/Calcineurina A	CALM2	NM_001743	PPP3CA	NM_005605
CaM/DAPK2	CALM2	NM_001743	DAPK2	NM_014326
CaM/MEF2C	CALM2	NM_001743	MEF2C	NM_002397
Caspasa 3/Cdc6	CASP3	NM_004346	CDC6	NM_001254
Caspasa 3/MST4	CASP3	NM_004346	MST4	NM_016542
Caspasa 3/1CAD	CASP3	NM_004346	DFFA	NM_004401
CBP/ATF-1	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)	ATF1	NM_005171
CBP/CBP	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)
CBP/CREB1	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)	CREB1	NM_134442
CCR5/PKC $\alpha$	CCR5	NM_000579	PRKCA	NM_002737
Cdc2/CiclinaB	CDC2	NM_001786	CCNB1	NM_031966
Cdc25A/Cdc2	CDC25A	NM_001789	CDC2	NM_001786
Cdc25C/14-3-3C	CDC25C	NM_001790	YWHAZ	NM_003406
Cdc25C/Cdc2	CDC25C	NM_001790	CDC2	NM_001786
Cdc42/Jnk2	CDC42	NM_001791	MAPK9	NM_002752
Cdc42/Pak4	CDC42	NM_001791	PAK4	NM_005884
Cdc42/WASP	CDC42	NM_001791	WASP	NM_000377
Cdk2/14-3-3 $\sigma$	CDK2	NM_001798	SFN	NM_006142
Cdk2/Axina	CDK2	NM_001798	Axin1	NM_009733
Cdk2/Cdc6	CDK2	NM_001798	CDC6	NM_001254
Cdk2/CiclinaE	CDK2	NM_001798	CCNE1	NM_001238
Cdk2/Mcm4	CDK2	NM_001798	MCM4	NM_005914
Cdk4/Ciclina D1	CDK4	NM_000075	CCND1	NM_053056
Cdk4/Rb	CDK4	NM_000075	RB1	NM_000321
Ghk1/Cdc25A	CHEK1	NM_001274	CDC25A	NM_001789
Chk1/Cdc25C	CHEK1	NM_001274	CDC25C	NM_001790
Chk1/Ku70	CHEK1	NM_001274	G22P1	NM_001469
Chk1/p53	CHEK1	NM_001274	TP53	NM_000546
Chk2/Chk2	CHEK2	NM_007194	CHEK2	NM_007194
Chk2/p53	CHEK2	NM_007194	TP53	NM_000546

ES 2 387 841 T3

(continuación)

Nombre de Ensayo	Gen _1	Nº de acceso de Gen _1	Gen _2	Nº de acceso de Gen _2
Crk/RalA	CRK	NM_005206	RALA	NM_005402
DGK $\alpha$ /c- <i>Src</i>	DGKA	NM_001345	CSK	NM_004383
Dnmt1/Histona H3A	Dnmt1	NM_010066	H3F3A	NM_002107
E2F1/CEBP $\epsilon$	E2F1	NM_005225	CEBPE	NM_001805
E6/E6AP	E6	NC_001526	E6AP	-----
E6/p53	E6	NC_001526	TP53	NM_000546
EDG2/G $\gamma$ 4	EDG2	NM_001401	GNG4	NM_004485
EGFR/CaM	EGFR	NM_00522827	CALM2	NM_001743
EGFR/Grb2	EGFR	005228	GRB2	NM_002086
eIF4E/4E-BP2	EIF4E	NM_001968	EIF4BP2	NM 004096
eIF4E/eIF4A	EIF4E	NM_001968	EIF4A1	NM 001416
eIF4E/eIF4G	EIF4E	NM_001968	EIF4G1	NM 198244
Elk1/SRF	ELK1	NM_005229	SRF	NM 003131
ER $\alpha$ /RXR $\alpha$	ESR1	NM_000125	RXRA	NM 002957
ER/SRC-1	ESR1	NM_000125	SRC-1	U40396 (nt 624..1256)
Erk2/Elk1	MAPK1	NM_002745	ELK1	NM_005229
Erk2/Mnk1	MAPK1	NM_002745	MKNK1	NM_003684
Erk2/p27	MAPK1	NM_002745	CDKN1B	NM_004064
FAK1/Socs-3	FAK1	NM_005607	Socs3	NM_007707
FXR/RXR $\alpha$	Nr1h4	NM_009108	RXRA	NM_002957
FXR/SRC-1	Nr1h4	NM_009108	SRC-1	U40396 (nt 624..1256)
Fz-4/G $\alpha$ (o)	FZD4	NM_012193	Gnao1	NM_010308
Fz-4/Grk2	FZD4	NM_012193	ADRBK1	NM_001619
Fz-4/RGS2	FZD4	NM_012193	RGS2	NM_002923
G $\alpha$ i/G $\beta$ 1	GNAI1	NM_002069	Gnb1	NM_008142
GLUT4/Sumo-1	GLUT4	NM_001042	SUMO1	NM_003352
Grk2/G $\alpha$ (o)	ADRBK1	NM_001619	Gnao1	NM_010308
Grk2/G $\gamma$ 2	ADRBK1	NM_001619	GNG2	XM_495987
Grk2/PKC $\alpha$	ADRBK1	NM_001619	PRKCA	NM_002737
Grk2/PKC $\zeta$	ADRBK1	NM_001619	PRKCZ	NM_002744
GRM3/G $\gamma$ 4	GRM3	NM_000840	GNG4	NM_004485
GSK3 $\beta$ /PP2A	GSK3B	NM_002093	PPP2CA	NM_004156
HDAC1/14-3-3 $\sigma$	HDAC1	NM_004964	SFN	NM_006142

ES 2 387 841 T3

(continuación)

Nombre de Ensayo	Gen _1	Nº de acceso de Gen _1	Gen _2	Nº de acceso de Gen _2
HDAC1/HDAC1	HDAC1	NM_004964	HDAC1	NM_004964
HDAC1/Stat1	HDAC1	NM_004964	STAT1	NM_007315
Histona H3/HDAC1	H3F3A	NM_002107	HDAC1	NM_004964
Histona H3/Histona H3	H3F3A	NM_002107	H3F3A	NM_002107
H-Ras/Raf1	HRAS	NM_005343	RAF1	NM_002880
Hsc70/p53	HSC70	NM_006597	TP53	NM_000546
Hsp90β/Akt1	HSPCB	NM_007355	AKT1	NM_005163
Hsp90β/Bid	HSPCB	NM_007355	BID	NM_001196
Hsp90β/Cdc37	HSPCB	NM_007355	CDC37	NM_007065
Hsp90β/Chk1	HSPCB	NM_007355	CHEK1	NM_001274
Hsp90β/Eef2k	HSPCB	NM_007355	Eef2k	NM_007908
Hsp90β/Mek1	HSPCB	NM_007355	Map2k1	Z16415
Hsp90β/Mek2	HSPCB	NM_007355	Map2k2	D14592
Hsp90β/Wee1	HSPCB	NM_007355	Wee1	NM_009516
ICAD/CAD	DFFA	NM_004401	DFFB	NM_004402
IκBα/p65	NFKB1A	NM_020529	Rela	NM_009045
IKKβ/IKKγ	IKBKB	NM_001556	IKBKG	NM_003639
IKKγ/p27	IKBKG	NM_003639	CDKNIB	NM_004064
IPP2/RIPK2	PPP1R2	NM_006241	RIPK2	NM_003821
ITGα5/ITGβ1	ITGA5	NM_002211	ITGB1	NM_002205
Jnk1/c-Jun	MAPK8	NM_002750	JUN	NM_002228
JNK2/ATF-2	MAPK9	NM_002752	ATF2	NM_001880
Jnk2/Cdc25C	MAPK9	NM_002752	CDC25C	NM_001790
Jnk2/Cdk2	MAPK9	NM_002752	CDK2	NM_001798
Ku70/Ku80	G22P1	NM_001469	XRCC5	NM_021141
Limk2/cofilina1	LIMK2	NM_005569	CFL1	NM_005507
LXRβ/RXRα	NR1H2	NM_007121	RXRA	NM_002957
Map3k8/Cik1	Map3k8	NM_005204	CLK1	NM_004071
Map3k8/PP1-r1α	Map3k8	NM_005204	PPP1R1A	NM_006741
MAPKAPK-2/Eef2k	MAPKAPK2	NM_032960	Eef2k	NM_007908
Mdm2/NPM1	MDM2	NM_002392	NPM1	NM_002520
Mdm2/p53	MDM2	NM_002392	TP53	NM_000546
Mek1/Erk2	Map2k1	Z16415	MAPK1	NM_002745



ES 2 387 841 T3

(continuación)

Nombre de Ensayo	Gen _1	Nº de acceso de Gen _1	Gen _2	Nº de acceso de Gen _2
Mek2/Jnk	Map2k2	D14592	MAPK8	NM_002750
Mevalonato	MVK	NM_000431	MVK	NM_000431
MKK6/p38 $\alpha$	MAP2K6	NM_002758	MAPK14	NM_001315
Mnk1/eIF4E	MKNK1	NM_003684	EIF4E	NM_001968
Myc/Max	MYC	NM_002467	MAX	NM_002382
NLK/c-Myb	NLK	NM_016231	Myb	NM_010848
eNos/CaM	Nos3	NM_008713	CALM2	NM_001743
NURR1/RXR $\alpha$	NR4A2	NM_006186	RXRA	NM_002957
Orc1/Orc2	ORC1L	NM_004153	ORC2L	NM_006190
p21/Cdc2	CDKN1A	NM_000389	CDC2	NM_001786
p21/CiclinaB	CDKN1A	NM_000389	CCNB1	NM_031966
p22(phox)/p47(phox)	CYBA	NM_000101	NOXO2	NM_000265
p27/CRM1	CDKN1B	NM_004064	XPO1	NM_003400
P2Y2r/G $\alpha$ 15	P2RY2	NM_002564	GNA15	NM_002068
P2Y2r/G $\gamma$ 4	P2RY2	NM_002564	GNG4	NM_004485
p38 $\alpha$ /Cdc25B	MAPK14	NM_001315	CDC25B	NM_021873
p38 $\alpha$ /Cdk2	MAPK14	NM_001315	CDK2	NM_001798
p38 $\alpha$ /Elk1	MAPK14	NM_001315	ELK1	NM_005229
p38 $\alpha$ /MAPKAPK-2	MAPK14	NM_001315	MAPKAPK2	NM_032960
p38 $\alpha$ /Max	MAPK14	NM_001315	MAX	NM_002382
p38 $\alpha$ /Mnk1	MAPK14	NM_001315	MKNK1	NM_003684
p38 $\alpha$ 1/Rad9	MAPK14	NM_001315	RAD9	NM_004584
p53/p53	TP53	NM_000546	TP53	NM_000546
p65/CBP	Reta	NM_009045	CREBBP	S66385 (nt 1..2313)
p65/p50	Reta	NM_009045	NFKB1	NM_003998
p70S6K/Map3k8	RPS6KB1	NM_003161	Map3k8	NM_005204
p70S6K/RIPK2	RPS6KB1	NM_003161	RIPK2	NM_003821
Pak4/Bad	PAK4	NM_005884	BAD	NM_004322
Pak4/Cofilina	PAK4	NM_005884	CFL1	NM_005507
Parvina-beta/ILK	PARVB	-----	ILK	NM_004517
Pcna/Pol $\delta$ (p50)	PCNA	NM_002592	POLD2	NM_006230
PCNA/Xrcc1	PCNA	NM_002592	Xrcc1	NM_009532
Pdk1/Akt	PDPK1	NM_002613	AKT1	NM_005163

ES 2 387 841 T3

(continuación)

Nombre de Ensayo	Gen _1	Nº de acceso de Gen _1	Gen _2	Nº de acceso de Gen _2
PFK-2/IPP2	PFKFB1	NM_002625	PPP1R2	NM_006241
PIAS1/Mdm2	PIAS1	NM_016166	MDM2	NM_002392
PIASy/p53	PIASy	NM_015897	TP53	NM_000546
PIASy/Smad3	PIASy	NM_015897	MADH3	NM_005902
Pin1/Cdc25C	PIN1	NM_006221	CDC25C	NM_001790
Pin1/c-Jun	PIN1	NM_006221	JUN	NM_002228
Pin1/p53	PIN1	NM_006221	TP53	NM_000546
Pin1/p70S6K	PIN1	NM_006221	RPS6KB1	NM_003161
PKC $\alpha$ /p47Nox	PRKCA	NM_002737	NOXO1	NM_144603
PP1c $\beta$ /HDAC1	PPP1CB	NM_002709	HDAC1	NM_004964
PP1-r1 $\alpha$ /PP-1B	PPP1R1A	NM_006741	PPP1CB	NM_002709
PP2A/Cdk2	PPP2CA	NM_002715	CDK2	NM_001798
PP2A/Mek1	PPP2CA	NM_002715	Map2k1	Z16415
PPAR $\gamma$ /RXR $\alpha$	PPARG	NM_138712	RXRA	NM_002957
2PAR $\gamma$ /SRC-1	PPARG	NM_138712	SRC-1	U40396 (nt 624..1256)
Pthr1/G $\alpha$ 15	Pthr1	NM_011199	GNA15	NM_002068
PTP $\alpha$ /c-Src	PTPRA	NM_080840	CSK	NM_004383
PTP $\alpha$ /Grb2	PTPRA	NM_080840	GRB2	NM_002086
PXR/RXR $\alpha$	PXR	NM_022002	RXRA	NM_002957
PXR/SRC-1	PXR	NM_022002	SRC-1	U40396 (nt 624..1256)
Rac1/Pak1	RAC1	NM_006908	PAK1	NM_002576
Rac1/Pak6	RAC1	NM_006908	PAK6	NM_020168
Rad1/Rad17	RAD1	NM_002853	RAD17	NM_133338
Rad9/HDAC1	RAD9	NM_004584	HDAC1	NM_004964
Rad9/Hus1	RAD9	NM_004584	HUS1	NM_004507
Rad9/p53	RAD9	NM_004584	TP53	NM_000546
Raf1/14-3-3 $\epsilon$	RAF1	NM_002880	SFN	NM_006142
Raf1/Cdc37	RAF1	NM_002880	CDC37	NM_007065
Raf1/Mek1	RAF1	NM_002880	Map2k1	Z16415
Raf1/Mek2	RAF1	NM_002880	Map2k2	D14592
RalB/RalBP1	RALB	NM_002881	RALBP1	NM_006788
RARB/RXR $\alpha$	RARB	NM_000965	RXRA	NM_002957
Rb/CiclofilinaA	RB1	NM_000321	PPIA	NM_021130

(continuación)

Nombre de Ensayo	Gen _1	Nº de acceso de Gen _1	Gen _2	Nº de acceso de Gen _2
RGS2/G $\alpha$ i2	RGS2	NM_002923	GNAI2	NM_002070
SCAP/Insig-1	SCAP	NM_012235	INSIG1	NM_005542
Smad3/HDAC1	MADH3	NM_005902	HDAC1	NM_004964
Smurf1/Smad1	SMURF1	NM_181349	MADH1	NM_005900
Speedy1/p27	SPDY1	NM_182756	CDKN1B	NM_004064
SRF/Sumo-1	SRF	NM_003131	SUMO1	NM_003352
SSTR2/G $\beta$ 1	SSTR2	NM_001050	Gnb1	NM_008142
Stat1/Stat1	STAT1	NM_007315	STAT1	NM_007315
Stat5a/Stat5b	STAT5A	NM_003152	STAT5B	NM_012448
STK15/Guk1	STK15	NM_003600	GUK1	NM_000858
Sintaxina:Sinaptabrevina2	STX4A	NM_004604	VAMP2	NM_U14232
TFCOUP2/SRC-1	Nr2f2	NM_009697	SRC-1	U40396 (nt 624..1256)
TF-COUP3/TFIIB	Nr2f6	NM_010150	GTF2B	NM_001514
THR $\alpha$ /RXR $\alpha$	THRA	NM_003250	RXRA	NM_002957
Tlk1/Asf1	TLK1	NM_012290	ASF1	NM_014034
TNFR1/FADD	TNFR1	NM_001065	FADD	NM_003824
TNFR1/TNFR1	TNFR1	NM_001065	TNFR1	NM_001065
TRAF2/p65	TRAF2	NM_021138	Rela	NM_009045
TRAF2/IkBa	TRAF2	NM_021138	NFKB1A	NM_020529
Vav/Cdc42	VAV	NM_005428	CDC42	NM_001791
VIPR2/G $\beta$ 1	VIPR2	NM_003382	Gnb1	NM_008142
WASP/Grb2	WASP	NM_000377	GRB2	NM_002086
Wee1/Cdc2	WEE1	NM_009516	CDC2	NM_001786
Xrcc1/Ape1	Xrcc1	NM_009532	JAPE1	NM_001641

**Tabla 2. Descripción de algunas de las proteínas usadas en la construcción del ensayo**

Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres
ACTA1	actina. alfa 1	Ephb4	HtX, MOK2, Myk1, Tyrol1	PAK4	Quinasa activada por p21(COKN1A)-4
ACTN1	actinina, alfa 1	Ephb6		PCKT1, isoforma a	PCTAIRE 1, PCTGAIRE
ACVR18		EPOR	receptor de eritropoyetina	PCKT1, isoforma b	PCTA1RE1, PCTGAIRE
Acvit1	receptor de activina A. parecido a tipo 11	ESR1	ER. ESR. Era, ESRA. NR3A1 (receptor de estrógenos 1 (alfa))	PCKT2	proteína quinasa PCTAIRE 2

(continuación)

Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres
ADPRT	PARP	FADD		PDGFRB	Receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas, polipéptido beta
AKT1	PKB (proteína quinasa B)	FAF1	hFAF 1, CGI-03, HFAFis; factor asociado a FAS- 1	Pdk1	proteína quinasa asociada con muerte 2
AKT2	PKB (proteína quinasa B)	FAK1	FAK, PTK2	PDK2	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 2
APC	poliposis adenomatosa de colón	FASTK	serina/treonina quinasa activada por Fas	PDK4	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 4
ARAF1	PKS2. A-RAF. RAFA1	FGFR4	receptor de factor de crecimiento de fibroblastos 4	PDPK1	
ARF		FGR	SRC2, c-fgr. p55c-trn	PED	
ARHA	RhoA	FKBP	proteína de unión a FK506	PHKG2	fosforilasa quinasa, gamma 2
ARRB2	ARB2, ARR2: arrestina, beta 2	FKHRL1		Plk3ca	mPI3k p110
ARR82	beta-arrestina-2, beta arr2	FKSGB1		PIK3R1	PI3X p85
AT1	AT1AR. AGTR1	FOS		PIM1	oncogén PIM1
Arin		FRB	dominio de unión a FKBP de FRAP/TOR murino	PIM2	proto-oncogén Pim-2 (serina treonina quinasa)
AXL	tirosina quinasa receptora de AXL	FRK	GTK. RAK: quinasa metilada	Pim3	
BAO		FRS2	SNT, SNT1. FRS2A, SNT-1. FRS2alfa: diana de factor neurotrófico asociado con suc1 (adaptador de señalización de FGFR)	Pkmyt1	quinasa inhibidora de cdc2 específica de tirosina y treonina asociada a membrana
BAK	BAK1, CDN1, BCL2L7: agente de muerte/ antagonista de BCL2 1: inhibidor de muerte celular 1	G22P1	Ku70	PLCG	PLCG1: PLC1, PLC-11, PLC18; PLC-gamma-1
BAX		GAB1	proteína de unión asociada con GRB2- 1	PLK	PLK1, STPK13: quinasa de tipo polo
BC033012		GADD45A		PPARG	Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma
BCL2	Proteína de linfoma de linfocitos B 2	GADD45B	detención del crecimiento e inducible por daño de ADN, beta	PPP2CA	PP2A, subunidad catalítica

(continuación)

Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres
BCLG	regulador de apoptosis BCL-G	GADD45G	detención del crecimiento e inducible por daño de ADN, gamma gwtuta	PPP2R1B	
BCL-X		GNAI3		PRKACA	proteína quinasa, dependiente de AMPc, catalítica, alfa
beta2AR	receptor beta2-adrenérgico, adrb2	GNAS1	proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G), polipéptido de actividad estimuladora alfa 1	PRKCA	
BID	agonista de muerte de dominio de interacción con BH3	Gnb1	proteína de unión a nucleótido guanina 1, beta	PRKCD	Proteína quinasa C. delta
BIK	BP4, NBK, BBC1, BIP1; agente de muerte de interacción con BCL2	GNG5	proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G), gamma 5	PRKCE	
BIM1		GPR34		Prkch	proteína quinasa C, eta
BIRC2	API1, MIHB, ciAP1, HIAP2, RNF48	GPRK5		PRKCI	proteína quinasa C, iota
BLK	tirosina quinasa linfocito B	GPRK6		Prkx	proteína quinasa, ligada a X
BMX	tirosina quinasa no receptora BMX	Gprk7	receptor acoplado a proteína G 7	PTEN	
BRCA1	cáncer de mama 1, aparición temprana	GPRK7	receptor acoplado a proteína G 7	PTPN11	proteína tirosina fosfatasa, tipo no receptor 11
BTRC	b-TrCP	GR82		PYK2	PTK2, FAK, FADK, FAK1, pp125FAK
BTRC	b-TrCP	GRB7		RAC1	familia rho. Proteína de unión a GTP pequeña Rac1
BUB1B	SUBR1, Bub1A, MAO3L; SUB1 gemación desinhibida por benzimidazoles 1 homólogo beta (levadura)	GS3955	TRB2: homólogo de tribbles 2	RAD1	HRAD1: proteína de punto de control de ciclo celular Hrad1
CAMK1	proteína quinasa dependiente de calmodulina/calcio 1	GSK3B		Rad17	proteína de punto de control de ciclo celular (RAD17)
CAMK2G	proteína quinasa dependiente de calmodulina/calcio 1 2G	H2AX	histona H2AFX: H2AX	Rad51	homólogo de RAD51 (homólogo de RecA, E. coli) ( <i>S. cerevisiae</i> )
CAMK4	proteína quinasa dependiente de calmodulina/calcio 4	HCK	JTK9; quinasa de célula hemopoyética	RAD9	RAD9A; homólogo de RAD9 ( <i>S. pombe</i> ) proteína de control del ciclo celular
Camkk1	proteína quinasa dependiente de calmodulina/calcio 1	HDAC1	histona desacetilasa 1	RAF1	

(continuación)

Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres	Gen/Proteína	Otros nombres
CAMKKB1		HIF1A	factor inducible por hipoxia- 1, alfa	RALA	
CASP9		HRAS		ralbp1	proteína de unión a rala 1
d-CATENIN	delta-catenina	HRI	factor de titulación regulada por heme 2-alfa quinasa	RAP1	RAPGA1;KREV-1, SMGP21, RAP1GAP, KIAA0474; RAP1, proteína activadora de GTPasa 1
CBP	Proteína de unión con elemento de respuesta a AMP cíclico	HSPA1L	tipo hsp70	RARa	receptor de ácido retinoide alfa
c-CBL		HSPB1	HSP27, HSP28, Hsp25. HS.76087; proteína de choque térmico de 27 kD en 1	RATP130CAS	
CCNB1	ciclina B1	HSPCB	hsp90, beta	RB1	retinoblastoma
CCND1	ciclina D1	Hus1	Homólogo de punto de control HUS1 ( <i>S. pombe</i> )		Rb2, p130
CCND2	ciclina D2	IKBKAP	IKAP	Reta	p65, p65 NFkB

**Tabla 3: Descripción de ensayos individuales y modulación de ruta (“estimulación”) cuando se usa**

	<u>Descripción de PCA</u>	<u>Estimulación</u>	<u>Gen de Genbank 01</u>	<u>Orientación de fusión del indicador</u>	<u>Gen de Genbank02</u>	<u>Orientación de fusión del indicador</u>
1	14-3-zeta: CDC25C +CPT	500 nM CPT; 16 h	BC003623	C	NM_001790	C
2	Akt1:p27		NM_005163	N	NM_004064	C
3	Akt1:PDPK1		NM_005163	N	NM_002613	c
4	BAD:BAD		NM_004322	N	NM_001196	c
5	bARR2: b2AR		NM_004313	N	NM_000024	c
6	bARR2: b2AR + ISO	Isoproterenol 2 μM; 30 min	NM_004313	N	NM_000024	c
7	Bcl-xL: Bad		NM_138578	C	M_004322	N
8	Bcl-xL: BIK		NM_138578	N	NM_001197	N
9	Cdc2:Cdc25A +CPT	500 nM CPT; 16 h	NM_001786	N	NM_001789	C
10	Cdc2: CDC25C		NM_001786	N	NM_001790	C

(continuación)

	<u>Descripción de PCA</u>	<u>Estimulación</u>	<u>Gen de Genbank 01</u>	<u>Orientación de fusión del indicador</u>	<u>Gen de Genbank02</u>	<u>Orientación de fusión del indicador</u>
11	Cdc2: CDC25C +CPT	500 nM CPT; 16 h	NM_001786	N	NM_001790	C
12	Cdc2:Wee1		NM_001786	N	NM_009516	N
13	CDC42:PAK4		NM_001791	N	NM_005884	C
14	Chk1: CDC25A +CPT	500 nM CPT; 16 h	NM_001274	N	NM_001789	C
15	Chk1: CDC25C		NM_001274	N	NM_001790	C
16	Chk1: CDC25C +CPT	500 nM CPT; 16 h	NM_001274	N	NM_001790	C
17	Cofilina:LIMK2		NM_005507	C	NM_005569	N
18	CiclinaB:Cdc2		NM_031966	N	NM_001786	C
19	CiclinaD:Cdk4		NM_053056	N	NM_001791	C
20	CiclinaE:Cdk2		NM_001238	N	NM_001798	N
21	E6:E6AP		AJ386069	N	NM_130839 (CDS 1729.. 2028)	C
22	E6:p53		AJ388069	N	NM_000546	N
23	Elk1:MAPK1		NM_005229	C	NM_002745	C
24	ESR1:SRC-1		NM_000125	N	U40396(CDS 624..1256)	N
25	Gai:b2AR		NM_006496	C	NM_000024	C
26	H-Ras:Raf		NM_005343	N	NM_002880	C
27	Hsp90: CDC37		NM_007355	C	NM_007065	N
28	Hsp90:Eef2k		NM_007355	C	NM_007908	N
29	Hsp90:MEK1		NM_007355	C	Z16415	N
30	MAPK9:ATF2		L31951	N	NM_001880	N
31	Mdm2:p53		BC009893	N	NM_000546	C

ES 2 387 841 T3

(continuación)

	<u>Descripción de PCA</u>	<u>Estimulación</u>	<u>Gen de Genbank 01</u>	<u>Orientación de fusión del indicador</u>	<u>Gen de Genbank02</u>	<u>Orientación de fusión del indicador</u>
32	MKNK1: MAPK1		NM_003684	C	NM_002745	C
33	MAX: MYC		NM_002382	C	NM_002467	C
34	NtCBP:JUN		S66385 (CDS 1..2313)	N	NM_002228	C
35	NtCBP:p65		S66385 (CDS 1..2313)	N	NM_009045	N
36	Cdc2: p21		NM_001786	N	NM_000389	N
37	P27: UbiquitinaC		NM_004064	N	NM_021009 (CDS 69..296)	N
38	p50:p65		NM_003998	N	NM_009045	N
39	p53:Chk1		NM_000546	C	NM_001274	N
40	p53:Chk1 +CPT	500 nM CPT; 16 h	NM_000546	C	NM_001274	N
41	p53:p53		NM_000546	C	NM_000546	C
42	p53:p53 +CPT	500 nM CPT; 16 h	NM_000546	C	NM_000546	C
43	PAK4:Cofilina		NM_005884	C	NM_005507	C
44	Pin1:CDC25C		NM_006221	c	NM_001790	c
45	Pin1:JUN		NM_006221	c	NM_002228	c
46	Pin1:p53		NM_006221	c	NM_000546	c
47	PXR:RXRa		BC017304	c	NM-002957	c
48	RAD9:p38a		NM_004584	c	NM_001315	N
49	RAD9:p53		NM_004584	c	NM_000546	N
50	Raf1:Map2k2		NM_002880	c	D14592	N
51	RB1:CDK4		BC040540	c	NM_001791	C
52	RXRa:PPARg		NM-002957	c	NM_138711	C
53	Smad3:HDAC		NM_005902	N	NM_004964	C



Tabla 4: Fármacos y concentraciones usados en ejemplo de realización de perfil farmacológico

Fármaco	Fuente	Concentración	Fármaco	Fuente	Concentración	Fármaco	Fuente	Concentración	Fármaco	Fuente	Concentración
(S)-(+)-Camptotecina	Sigma	500 nM	GGTI-2133	Calbiochem	5 microM	Quetiapina	Sequoia	2 microM			
17-AAG	Tocris	5 microM	Gleevec	Novartis	10 microM	Raloxifeno	LKT Labs, Inc.	500 nM			
Acetil ceramida	Sigma	10 microM	G6 6976	Calbiochem	100,00 nM	Rapamicina	Calbiochem	250 nM			
ALLN	Calbiochem	25 microM	GSK-3 Inh. II	Calbiochem	1 microM	Risperidona	Sequoia	2 microM			
Aminoglutetimida	Microsource	30 microM	(GW)1929	Alexis	3 microM	Rofecoxib	Sequoia	10 microM			
Angiogenina	Sigma	100 ng/ml	H-89	Calbiochem	2 microM	Rollpram	Calbiochem	25 microM			
Angiotensina II	Calbiochem	300 nM	HA14-1	Tocris	2 microM	Roscovitina	Calbiochem	5 microM			
Apigenina	Calbiochem	50 microM	HDAC Inh. I	Calbiochem	10 microM	Rosiglitazona	LKT Labs, Inc.	15 microM			
Óxido Arsénico (III)	Sigma	5 microM	Indirrubin-3-Monoxima	Calbiochem	10 microM	Rosuvastatina	Sequoia	30 microM			
ATRA	Sigma	5 microM	Isoproterenol	Sigma	2 microM	Rotenona	Sigma	300 nM			
BAY 11-7082	Calbiochem	10 microM	Ketoconazol	Sigma	30 microM	Salbutamol	Sigma	2 microM			
Bicalutamida	Sequoia	500 nM	L-744.832	Sigma	10 microM	Sarafotoxina S6b	Calbiochem	100 nM			
Brefeldina A	Sigma	50 mg/ml	Leptomicina B	Sigma	10.00 ng/ml	SB 203580	Calbiochem	25 microM			
Cafeína	Sigma	50 microM	Letrozol	Sequoia	1.50 microM	SC-560	Calbiochem	250 nM			
Caliculina A	Calbiochem	2nM	Cloruro de litio	Sigma	1000 microM	Sildenafil	Sequoia	1 microM			
Celecoxib	Sequoia	10 microM	Lovastatina	Calbiochem	30 microM	Simvastatina	Calbiochem	30 microM			
Cervistatina	Sequoia	30 microM	LPA	Sigma	5 microM	Tadalafilo	Sequoia	1 microM			
Ciglitazona	Calbiochem	15 microM	LY 294002	Calbiochem	25 microM	Tamoxifeno	Calbiochem	500 nM			
Cilostazol	Sigma	2 microM	Mevastatina	Calbiochem	30 microM	Taxol	Calbiochem	2,5 microM			
Ciprofibrato	sigma	30 microM	MG 132	Tocris	1 microM	Talidomida	Calbiochem	250 microM			
Clembuterol	Sigma	2 microM	Milrinona	Sigma	200 nM	Toremifeno	Sequoia	500 nM			

(continuación)

<u>Fármaco</u>	<u>Fuente</u>	<u>Concentración</u>	<u>Fármaco</u>	<u>Fuente</u>	<u>Concentración</u>	<u>Fármaco</u>	<u>Fuente</u>	<u>Concentración</u>
Clofibrato	Sigma	30 microM	Olanzapina	Sequoia	2 microM	TRAIL	Sigma	50,00 ng/ml
Clozapina	Sequoia	2 microM	Paroxetina	Sequoia	10 microM	Tricostatina A	Calbiochem	5 microM
DBH	Calbiochem	5 microM	Patulina	Sigma	10 microM	Troglitazona	Calbiochem	15 microM
Dexametasona	Sigma	500 nM	PD 158780	Calbiochem	1 microM	Tirfostina AG 1296	Calbiochem	5 microM
Epotilona A	Calbiochem	100 nM	PD 98059	Calbiochem	20 microM	Tirfostina AG 1433	Calbiochem	25 microM
Estrógeno	Calbiochem	500 nM	PD153035	Calbiochem	200 nM	Valdecoxib	Sigma	10 microM
Exemestano	Sequoia	1,50 microM	Toxina Pertussis	Sigma	100 ng/ml	Vardenafilo	Sequoia	1 microM
Fluvastatina	Calbiochem	30 microM	Pifitrina-a	Calbiochem	50 microM	Wortmanina	Calbiochem	500 nM
Fulvestrant	Tocris	500 nM	Pioglitazona	Calbiochem	15 microM	Y-27632	Calbiochem	25 microM
Geldanamicina	Calbiochem	2,5 microM	Pravastatina	Calbiochem	30 microM	Ziprasidona	Sequoia	2 microM
Gemfibrozilo	Sigma	30 microM	Propranolol	Calbiochem	2 microM	ZM 336372	Calbiochem	5 microM
Genisteína	Calbiochem	12,5 microM	PTPBS	Calbiochem	500 nM			

**Líneas celulares estables**

Para varias interacciones, se generaron líneas celulares estables. Para p50/p65 y IκBα/p65, se transfectaron células HEK293 con el vector de fusión YFP [2]-p65 y se seleccionaron líneas celulares estables usando higromicina B 100 μg/ml (Invitrogen). Se transfectaron posteriormente las líneas celulares seleccionadas con YFP [1]-p50 o IκBα-YFP [1] y se aislaron líneas celulares que expresaban YFP[1]-p50/YFP[2]-p65 y IκBα-YFP [1]/YFP [2]-p65 después de selección de doble antibiótico con higromicina B 50 μg/ml y zeocina 500 μg/ml. Para B2AR/B-arrestina, se transfectaron células HEK293 con el vector de fusión arrestina β-YFP[1] y se seleccionaron líneas celulares estables usando zeocina 1000 μg/ml. Las líneas celulares seleccionadas se transfectaron posteriormente con el vector de fusión beta2-AR-YFP[2] y las líneas celulares estables que expresaban YFP[1]-beta-arrestina/beta2-AR-YFP[2] se aislaron siguiendo la selección de doble antibiótico con higromicina B 200 μg/ml y zeocina 500 μg/ml. Para Akt1/PDK1, se co-transfectaron células HEK293 con los vectores de fusión YFP[1]-Akt1 y PDK1-YFP[2] y se seleccionaron líneas celulares estables usando zeocina 1000 μg/ml. Para todas las líneas celulares, las señales de fluorescencia eran estables durante al menos 25 pases (datos no mostrados). Aproximadamente 24 horas antes de los tratamientos farmacológicos, las células se sembraron en placas revestidas con poli-D-lisina de 96 pocillos (Greiner) usando un sistema de bomba peristáltica Multidrop 384 (Thermo Electron Corp., Waltham, Mass).

**Estudio farmacológico**

Se co-transfectaron células HEK293 (7.500 por pocillo) con 100 ng de los vectores de fusión complementarios usando Eugene 6 (Roche) de acuerdo con el protocolo del fabricante. 24 ó 48 horas después de la transfección, las células se exploraron frente a fármacos en pocillos duplicados como se describe posteriormente. Para estudios farmacológicos con p50:p65, betaArr2:beta2AR y Akt1:Pdk1, se sembraron líneas celulares estables 24 horas antes de tratamiento farmacológico.

Se ensayaron 107 fármacos diferentes (los nombres y dosis se enumeran en la Tabla 4) frente a 49 ensayos distintos por duplicado en uno o más puntos temporales. Las concentraciones farmacológicas se seleccionaron a aproximadamente tres veces (3 X) las  $CI_{50}$  celulares publicadas y se ensayaron para asegurar falta de toxicidad en células HEK293. Todas las etapas de manipulación de líquidos se realizaron usando un Biomek FX (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Se incubaron células que expresaban los pares de PCA en medio de cultivo que contenía fármacos durante 30 minutos, 90 minutos y 8 horas o, en el caso de rutas de respuesta a daño de ADN, durante 18 horas. Para ciertas rutas, las células se trataron en primer lugar con fármacos y después se estimularon con agonista, (CPT, TNFalfa o isoproterenol) para inducir la ruta. De esta manera, pudieron identificarse fármacos que bloquean una ruta dependiente de agonista. Después de los tratamientos farmacológicos las células se tificaron simultáneamente con Hoechst 33342 33 μg/ml (Molecular Probes) y aglutinina de germen de trigo conjugada con TexasRed 15 μg/ml (WGA; Molecular Probes), y se fijaron con formaldehído 2 % (Ted Pella) durante 10 minutos. Las células se aclararon posteriormente con HBSS (Invitrogen) y se mantuvieron en el mismo tampón durante la adquisición de imágenes.

**Análisis de imágenes de fluorescencia**

Se adquirieron imágenes celulares con una cámara de fluorescencia automática Discovery-1 (Molecular Devices, Inc.) equipada con un brazo robótico (CRS Catalyst Express; Thermo Electron Corp., Waltham, Mass). Se usaron los siguientes conjuntos de filtros para obtener imágenes de 4 poblaciones no solapantes de células por pocillo: filtro de excitación 480 +/-40 nm, filtro de emisión 535 +/-50 nm (YFP); filtro de excitación 360 +/-40 nm, filtro de emisión 465 +/-30 nm (Hoechst); filtro de excitación 560 +/-50 nm, filtro de emisión 650 +/- 40 nm (Texas Red; estudio farmacológico). Se adquirieron cuatro exploraciones para cada pocillo representando cada exploración 150-300 células. Se usó un tiempo de exposición constante para cada longitud de onda para adquirir todas las imágenes para un ensayo dado.

Se analizaron imágenes sin procesar en formato TIFF de escala de grises de 16 bits usando módulos de la biblioteca ImageJ API (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, NIH, MD). En primer lugar, se normalizaron imágenes de cada canal de fluorescencia (Hoechst, YFP y Texas Red; el último sólo para el estudio farmacológico) usando el algoritmo de esfera rodante incorporado ImageJ. (Sternberg, 1983). Puesto que cada PCA genera señal en un compartimiento u orgánulo subcelular específico, y el tratamiento con un fármaco puede efectuar un cambio en la localización del complejo o intensidad de señal, se requirieron diferentes algoritmos para cuantificar de forma precisa señales fluorescentes localizadas en la membrana, núcleo o citosol. Cada ensayo se categorizó de acuerdo con la localización subcelular de la señal fluorescente y se cuantificaron cambios en la intensidad de señal a lo largo de cada población de muestra usando uno de cuatro algoritmos de análisis de imagen automáticos.

Algoritmo 1: Se cuantificaron cambios de la fluorescencia media por toda la célula completa después de la generación de máscaras basadas en imágenes de YFP (señal de PCA), Texas red (WGA; tinción de membrana) o Hoechst (tinción nuclear) con autoumbral. Se usó un histograma obtenido de la imagen de YFP sin umbral (YI) para definir el fondo global (la media del pico de intensidad más baja). La superposición de las tres máscaras definió partículas individuales (que se aproximan a las células). Se tomaron muestras de píxeles positivos dentro de la YI para calcular la intensidad de píxel media para todas las partículas positivas dentro de una exploración (media de partículas positivas, PPM).

Algoritmo 2: Para medir cambios de la fluorescencia restringida al núcleo, se tomaron muestras de todos los píxeles por encima de un valor de selección definido por el usuario que quedaron dentro de la máscara nuclear de la YI para determinar la fluorescencia nuclear media y fluorescencia nuclear total (normalizada a área de Hoechst) dando como resultado Suma de Nuc o Nuc media.

- 5 Algoritmo 3: Para medir cambios poblacionales de la fluorescencia total, se tomaron muestras de todos los píxeles por encima de un valor de selección definido por el usuario de la YI para determinar la fluorescencia total media y fluorescencia total (normalizada a área de Hoechst) dando como resultado suma de volumen o medio de volumen.

Algoritmo 4: Para medir cambios de la fluorescencia en la membrana, se usó una máscara basada en la imagen de Texas Red con umbral (WGA) para tomar muestras de píxeles dentro de la región de membrana. Se tomaron 10 muestras de píxeles asociados a membrana por encima de un valor de selección establecido manualmente para determinar la fluorescencia de membrana media.

Para todos los algoritmos, los datos se corrigieron con respecto a fondo global antes de calcular los valores medios. Para cada ensayo se generaron conjuntos de ensayo de las imágenes. Cada conjunto incluyó imágenes de células tratadas con vehículo solamente (control) e imágenes de células tratadas con un compuesto de identificación (modulador conocido del ensayo). La fluorescencia en las imágenes se cuantificó con cada algoritmo, y los 15 resultados se compararon con puntuaciones manuales de las imágenes para identificar el algoritmo más adecuado para cuantificar diferencias entre la muestra tratada y el control.

El efecto de cada tratamiento en cada ensayo se comparó con el resultado para el control de vehículo (PBS para isoproterenol y propranolol; DMSO para todos los otros fármacos). Para datos generados por el algoritmo 1, se 20 agrupó la PPM para cada punto de datos (par de PCA/estímulo/fármaco) de al menos 8 exploraciones. Se aplicó un filtro externo para excluir las partículas que quedaban fuera del intervalo del grupo (media  $\pm$  3DT) antes de calcular la PPM para la muestra completa. Para los algoritmos 2 -4, la suma de Nuc, suma de volumen o suma de Mem para cada muestra representa la media de al menos 8 exploraciones para fármacos después de aplicación de un filtro 2DT para excluir exploraciones con artefactos fluorescentes. Se repitieron los resultados del estudio farmacológico 25 en al menos tres experimentos separados para fármacos “distintivos” y mostraron concordancia entre los experimentos repetidos.

### Matrices y agrupamiento

En las matrices, cada fila representa un fármaco único y cada columna representa un ensayo único en un punto 30 temporal particular en ausencia o presencia de un modulador de ruta tal como TNFalfa, CPT o isotretenerol. Cada punto de datos se formó tomando el logaritmo de la relación de la muestra y el control. Cada fila y columna tiene el mismo peso. El algoritmo de agrupamiento jerárquico de Ward (Ward, 1963) y métrica de distancia euclídea (<http://www.r-project.org/>) se usaron para agrupar los tratamientos. Para fines de presentación, cada punto de datos dentro de la matriz se codifica por colores para ilustrar diferencias relativas dentro de un ensayo. Se presenta un 35 aumento en relación con el valor de control en verde y se presenta una reducción en rojo. Cada color se divide adicionalmente en dos niveles: nivel 1 (2x. CV) o nivel 2 (1,5 x CV). El nivel uno se presenta como el tono más claro y el nivel 2 como el tono más oscuro.

### Resultados

#### Alcance de la invención

Los inventores han mostrado que la presente invención proporciona un procedimiento universal para realización de 40 perfiles farmacológicos y descubrimiento de fármacos, que puede aplicarse a cualquier compuesto de ensayo, fármaco, sustancia tóxica, diana farmacológica, ruta o célula de interés. Se muestran numerosos ejemplos en las Figuras 6-16 de una amplia serie de proteínas y rutas.

La invención permite la identificación de efectos en ruta y fuera de ruta de fármacos y posibilita la mejora de 45 candidatos farmacológicos a través de optimización de candidatos y retirada selectiva. La invención puede aplicarse por etapas para evaluar las propiedades de candidatos farmacológicos, modificar esas propiedades y volver a ensayar los candidatos modificados. Con este enfoque, son posibles estudios de actividad-estructura celular en los que las estructuras de compuestos químicos se ligan a resultados de ensayo particulares y perfiles farmacológicos, lo que permite la identificación de constituyentes químicos deseados y no deseados. De esta manera, la invención es un ejemplo de genómica química, puesto que permite la detección de efectos químicos a una escala genómica en 50 un sistema biológico. La invención puede usarse con ensayos basados en células o *in vitro*, aunque los ensayos basados en células, como se usa en el presente documento, requieren menos manipulación.

#### **Efectos en ruta y fuera de ruta de fármacos, sustancias tóxicas y compuestos candidatos**

La Figura 6(A-B) muestra ejemplos de interacciones en rutas de GPCR. La Figura 7(A-C) muestra ejemplos de 55 interacciones en las rutas de ubiquitina/sumo/proteasoma y efectos farmacológicos en esas rutas. La Figura 8 (A-D) muestra ejemplos de interacciones en rutas de señalización de quinasa y efectos farmacológicos en esas rutas. La Figura 9 (A-B) muestra ejemplos de interacciones en rutas de proteínas de choque térmico, y efectos farmacológicos

en esas rutas. La Figura 10 (A-B) muestra ejemplos de interacciones en rutas del receptor de hormonas nucleares, y efectos farmacológicos en esas rutas. La Figura 11 (A-B) muestra ejemplos de interacciones en rutas apoptóticas y efectos farmacológicos en esas rutas. La Figura 12 muestra ejemplos adicionales de efectos farmacológicos (en ausencia o presencia de moduladores de ruta) en diversas rutas. La Figura 13 (A-B) muestra perfiles farmacológicos representados como histogramas. La Figura 14 ilustra la estrategia de modulación de ruta con resultados para rutas de respuesta a daño de ADN. La Figura 15 (A-B) ilustra la estrategia de modulación de ruta con resultados para una ruta de GPCR. Estos ejemplos se seleccionaron para representar clases diana de fármacos conocidos; estos ejemplos, y las interacciones enumeradas en la Tabla 1, se proporcionan para ilustrar la amplitud de la invención, y no se pretende que limiten el alcance o uso de la invención. La invención puede aplicarse a cualquier proteína en cualquier ruta. Se analizan posteriormente ejemplos de interacciones proteicas y efectos farmacológicos.

Con esta estrategia, pueden verse efectos farmacológicos en un periodo de minutos u horas de tratamiento farmacológico, lo que permite la determinación de efectos tanto a corto plazo como a largo plazo. La Figura 12 (A-D) muestra imágenes representativas para 17 complejos proteicos conocidos que se modulan por mecanismos conocidos, incluyendo modificaciones post-traduccionales, degradación o estabilización de proteínas o translocación de proteínas. Cada fármaco mostrado provocó un aumento, reducción o un desplazamiento de la localización subcelular de la señal para un complejo particular en un momento particular del tratamiento en comparación con el control de vehículo apropiado. Las imágenes de diversos complejos muestran las localizaciones predominantemente de membrana, nucleares y citoplasmáticas de los complejos respectivos, destacando la naturaleza de alto contenido de estos ensayos y la capacidad para resolver localización subcelular de señales con microscopía automática.

Por ejemplo, muchas quinasas interactúan con chaperonas tales como Hsp90 y Cdc37 (Perdew y col, 1997; Stancato y col, 1993, Arlander y col, 2003). Se mostraron imágenes de tales interacciones en la Figura 12 (A). Los inhibidores farmacológicos de HSP (geldanamicina o 17-alilamino-geldanamicina [17-AAG]) provocaron la pérdida de numerosos complejos que implicaban proteínas cliente. Por ejemplo, Akt1:Hsp90beta, Akt1:p27, Cdc37:Akt1 y Akt1:Pdk1 fueron todas sensibles a geldanamicina y 17AAG como lo fueron H-Ras:Raf-1, Chkl:Cdc25C, Cdc2:Cdc25C; Cdc2:Weel; y Chk1:p53. Los ejemplos de los efectos de geldanamicina y 17AAG en los complejos de Akt1 se muestran en la Figura 12 (A) y en la Figura 9B. Por lo tanto las asociaciones físicas y funcionales entre dianas, así como efectos farmacológicos específicos en las dianas, pueden determinarse tratando células vivas con fármacos y controlando los complejos proteicos dentro de rutas de interés.

En otro ejemplo, el receptor beta 2 adrenérgico (beta2AR) interactúa con beta-arrestina (beta-ARR2) después de fosforilación inducida por ligando del receptor por quinasas de GPCR (GRK) (Lin y col, 2002). En ausencia de agonista, no hubo complejos betaArr2:beta2AR visibles (Figura 15 panel izquierdo). El tratamiento de células con el agonista adrenérgico, isoprotenerol, provocó la formación de numerosos complejos betaArr2:beta2AR en un periodo de minutos (Figura 15 panel derecho). La microfotografía de fluorescencia en la Figura 15 muestra un patrón citoplásmico puntuado que es coherente con el curso temporal de unión de arrestina con el receptor y posterior internalización mediante depresiones revestidas de clatrina (Zhang y col, 1996). El pretratamiento de células con el agonista inverso, propranolol, evitó la interacción inducida por isoproterenol e internalización de betaArr2:beta2AR como se predeciría (Zhang y col, 1996). Estos resultados destacan la capacidad de este enfoque para detectar efectos temporales de agonistas y antagonistas directamente en sus dianas conocidas. Puesto que muchos GPCR se acoplan a beta-arrestina, estas y cualquier otra interacción corriente abajo puede explorarse con esta estrategia.

Una característica clave de la invención es la capacidad para distinguir efectos de diferentes fármacos a diferentes niveles de jerarquía de la ruta, como se ilustra en los siguientes ejemplos. En células en proliferación, fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) recluta Pdk y Akt a la membrana celular (Anderson y col, 1998). Wortmanina y LY294002 son inhibidores conocidos de PI3K (Vlahos y col, 1994), que evita la síntesis de receptores de membrana de fosfoinositida (PIP<sub>3</sub>) para Akt, evitando de este modo la translocación de Akt a la membrana en la que se fosforila y se activa por quinasa dependiente de fosfatidilinositol 3 (Pdk1). Los inventores estudiaron los efectos de fármacos en rutas que implican Akt evaluando el complejo entre Akt1 y quinasa dependiente de fosfatidilinositol 3 (Pdk1) y entre Akt1 y el inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, p27 (CDKN1B; Kipl), que desempeña un papel en la regulación del ciclo celular. En pocillos de control, los complejos Akt1:Pdk1 se localizaron predominantemente en la membrana celular (Figura 8C) mientras que los complejos Akt1:p27 se concentraron en el núcleo celular (Figura 9B). Wortmanina y LY294002 provocaron una rápida relocalización de Akt1:Pdk1 de la membrana al citoplasma y una reducción de los complejos Akt1:Pdk1 totales (Figura 8C) pero no tuvieron efecto significativo en Akt1:p27 (no mostrado). Sin embargo, ambos complejos fueron sensibles a geldanamicina y 17-AAG. Estos resultados sugieren que el grupo de complejos Akt1:p27 en el núcleo es insensible a fármacos que actúan en una etapa temprana de señalización de Akt. Las localizaciones y respuestas definidas de Akt1:Pdk1 y Akt1:p27 ilustran que cada ensayo informa sobre la biología de un complejo Akt particular en lugar del grupo celular total de Akt, una característica crucial para detectar efectos únicos de fármacos en procesos y compartimentos celulares definidos. Los inhibidores de quinasa con efectos corriente arriba pueden detectarse explorando interacciones corriente abajo. Esto se muestra en la Figura 12D, en la que LY294002 indujo complejos p53:p53 en presencia de CPT y en la Figura 8D, en la que dos inhibidores de quinasa no específicos diferentes redujeron los complejos H-Ras1:Raf-1. Estos resultados validan ambos la utilidad de la estrategia de realización de perfil de red que se presenta en diagrama en la Figura 3 y muestran que pueden detectarse efectos en ruta así como fuera de ruta con la invención.

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) representan una clase de proteínas diana para fármacos principal, como lo son los receptores de factor de crecimiento/citocinas, y receptores de hormonas nucleares. Los receptores de hormonas nucleares modulan los efectos de esteroides tales como estrógeno y testosterona, los efectos de retinoides y de agentes sintéticos tales como las tiazolidinedionas y fibratos. Los agonistas de receptores de hormonas nucleares se comercializan para una diversidad de indicaciones incluyendo el tratamiento de enfermedad metabólica, diabetes e hiperlipidemia. La Figura 10A ilustra algunas de las interacciones en estas rutas y los efectos de un agonista conocido, rosiglitazona (comercializado como Avandia) en su diana receptora, PPARgamma. Tales ensayos pueden usarse para explorar cualquier variedad de receptores conocidos o huérfanos y para determinar si los compuestos de ensayo activan o inhiben estas interacciones. Además, pueden usarse agonistas conocidos tales como rosiglitazona junto con la estrategia de modulación de ruta presentada en diagrama en la Figura 14A para identificar agentes que bloquean estas rutas activadas.

Además de las rutas mediadas por chaperona, GPCR, hormona nuclear y quinasa analizadas anteriormente, la Figura 12 muestra ejemplos de complejos implicados en procesos mediados por GTPasa dinámicos, el citoesqueleto, el ciclo celular, apoptosis, rutas de respuesta a daño de ADN e interacciones del receptor de hormonas nucleares. Se describen en el presente documento efectos representativos de fármacos en estas rutas como se detectan por estos complejos indicadores.

Se reconocen interacciones de GTPasa con proteínas efectoras como conmutaciones moleculares clave. La Figura 8D y Figura 13A ilustran un complejo efector de quinasa:GTPasa prototípico (H-Ras:Raf1) que era sensible a inhibidores de quinasa no selectivos, incluyendo BAY 11-7082. BAY 11-7082, originalmente identificado como un inhibidor de IKK, también bloqueó la translocación de p50:p65 (NFkappaB) del citoplasma al núcleo en respuesta a TNFalfa, como se esperaría (Figura 12B) (Thevenod y col, 2000). Con respecto a rutas que controlan la morfología del citoesqueleto, LIM quinasa 2 (Limk2) inactiva el factor de despolimerización de actina cofilina (Sumi y col, 1999). Los complejos de cofilina:Limk2 se eliminaron casi completamente por el inhibidor de quinasa indirubina-3'-monoxima (Figura 12C). Las proteínas del ciclo celular que se estudiaron incluyeron Cdc25C, Cdk4, ciclina D1 y p53. El tratamiento con el inhibidor de proteasoma, ALLN, dio como resultado la acumulación gradual de ciclina D1:Cdk4 en el núcleo (Figura 12B y 13B), coherente con la regulación de niveles de ciclina D1 por el proteasoma 26S (Diehl y col, 1997). Isoprotenerol indujo Mnk1:Erk2, un resultado que es coherente con informes previos de actividad MAPK inducida por agonista adrenérgico (Figura 12D) (Daaka y col, 1997; Muhlenbeck y col, 1998). Como se ha mencionado anteriormente, LY294002 aumentó p53:p53, lo que es coherente con informes de que Akt fosforila y activa Mdm2, potenciando la ubiquitinación y degradación de p53 (Ogawara y col, 2002). Finalmente, los complejos de los factores de transcripción activados por ligando, PPARgamma:SRC-1 (Figura 12B) y PPARgamma:RXRalfa. (Figura 10A) aumentaron en respuesta al tratamiento con el agonista de PPARgamma, conocido, rosiglitazona, como se predijo (Nolte y col,) 1998.

Los inventores observaron efectos interesantes de fármacos particulares que son nuevos pero son coherentes con informes publicados de organización de rutas. La proteína citocina TRAIL, que es un ligando de familia TNFalfa (Wiley y col, 1995) aumentó Bcl-xL:Bad (Figura 12B). Además, el inhibidor de proteína quinasa, Gö6976, aumentó los complejos de PAK4 con la proteína citoesquelética cofilina (Figura 12D). En levadura, se activan homólogos de Cdc42 y PAK y se produce un cambio citoesquelético, a medida que las células progresan hasta la fase G2/M del ciclo celular (Richman y col, 1999). Gö6976 es un potente inhibidor de quinasas de punto de control (Chk) (Kohn y col, 2003) y facilita la progresión hasta G2/M. Por lo tanto, la activación mediada por Gö6976 de procesos corriente abajo de Cdc42/PAK, tales como PAK4:cofilina, no es sorprendente. Los inventores también demuestran por primera vez imágenes de un complejo nuclear que contiene un factor de transcripción (c-Jun) y una proil isomerasa (Pin1). Pin1 se une a Jun, después de fosforilarse y activarse por la quinasa JNK (Wulf y col, 2001). Los inventores observaron fuerte inhibición de complejos Pin1:Jun después del tratamiento celular con clofibrato (Figura 12D). Se ha mostrado que el clofibrato, un agonista de PPARalfa, aumenta la asociación de PPARalfa con sus co-reguladores transcripcionales y reduce la actividad transcripcional de c-Jun (Yokoyama y col., 1993) lo que conduce a la sugerencia por los presentes autores de una interacción directa de PPARgamma y c-Jun. Además, se ha demostrado que los agonistas de PPARgamma inhiben la actividad de la ruta JNK (Irukayama-Tomobe y col., 2004), lo que conduciría a una reducción de complejos Pin1:Jun, como observaron los inventores.

En resumen, podrían detectarse efectos farmacológicos tanto esperados como inesperados en una amplia serie de clases diana y procesos celulares en puntos temporales cortos y/o largos controlando complejos proteicos y sus respuestas a tratamiento farmacológico.

#### **Los fármacos relacionados químicamente tuvieron actividades comunes en el panel de ensayos celulares**

Los ejemplos presentados anteriormente ilustran que los efectos individuales de fármacos en procesos y rutas celulares pueden determinarse analizando la dinámica espacial y temporal de complejos proteicos. Los inventores extendieron este enfoque a la realización de perfiles farmacológicos de 107 fármacos diferentes (Tabla 4) que se dirigían a 6 áreas terapéuticas (cáncer, inflamación, enfermedad cardiovascular, diabetes, trastornos neurológicos, enfermedades infecciosas) o que actúan como moduladores generales de mecanismos celulares (por ejemplo, transporte de proteínas). Los inventores se centraron en concentraciones de fármacos fisiológicamente relevantes para evitar efectos fuera de diana generalizados observados con frecuencia con dosificación de compuesto por encima de la fisiológica. Los fármacos se ensayaron en múltiples puntos temporales que variaban de 30 minutos a

16 horas para captar efectos temporales tempranos en las rutas celulares. Como ejemplo, algunos compuestos inducen un aumento continuo en las señales de ensayos a lo largo del tiempo mientras que otros provocan un cambio bifásico en la intensidad de señal y otros tratamientos farmacológicos dan como resultado reducciones de la intensidad de señal a lo largo del tiempo.

5 Los datos cuantitativos para todos los resultados de ensayo/fármaco se presentan en una matriz codificada por colores agrupada tanto para fármacos como para puntos temporales de ensayos individuales (Figura 17A) y se muestra una vista expandida del dendrograma de grupos farmacológicos en la Figura 17B. Notablemente, los fármacos se agruparon principalmente en clases diana de estructura conocida, a pesar del hecho de que los ensayos no se seleccionaron intencionadamente para informar acerca de rutas a las que se dirigen los fármacos.

10 Los resultados sugieren que los efectos farmacológicos compartidos en procesos celulares podrían elucidarse evaluando la dinámica de complejos proteicos dentro de las redes de señalización celular altamente ramificadas. Grupos de fármacos estructuralmente relacionados, con dianas celulares según se ha informado similares o idénticas, generaron grupos funcionales (Fig. 17B). Estos incluyeron los inhibidores de proteasoma ALLN y MG-132; los agonistas de GPCR beta adrenérgicos, isoproterenol, clenbuterol y salbutamol; los inhibidores de HSP90, 17-AAG y geldanamicina; y los agonistas de PPARgamma, pioglitazona, rosiglitazona y troglitazona. En estos y otros ejemplos, las similitudes de los perfiles farmacológicos, que condujeron a los grupos observados, se asociaron con características estructurales compartidas dentro de grupos farmacológicos.

Pueden usarse sustancias tóxicas conocidas junto con la presente invención, tanto para estudiar mecanismos que subyacen en la toxicidad como para establecer perfiles farmacológicos relacionados con mecanismos tóxicos específicos. Los compuestos candidatos y otros agentes de ensayo pueden compararse después con las sustancias tóxicas conocidas para determinar si el compuesto de ensayo tiene actividades similares. Por ejemplo, el cloruro de cadmio tiene efectos pronunciados en múltiples rutas, como se muestra en la Figura 16A. Algunas de estas se conocen o se esperan, tales como el efecto del cadmio en NFkappaB (p50:p65) y tanto los efectos inesperados como los esperados del cadmio podrían precisarse en estos ensayos. Los perfiles de compuestos candidatos se compararon con los perfiles de cadmio, como se muestra en la Figura 16B. Dos candidatos químicos patentados tuvieron perfiles que eran similares al del cadmio. Se documentó posteriormente que estos compuestos producían toxicidad hepática en roedores. La realización de perfiles farmacológicos de los candidatos de acuerdo con la presente invención habría identificado esas actividades antes de los estudios animales, ahorrando tiempo y dinero en ensayos preclínicos.

30 Se desean algunas actividades de fármacos en ciertos contextos, pero estas son indeseables en otros contextos. La invención puede usarse para identificar estas actividades. La Figura 15B muestra que un compuesto candidato patentado, originalmente diseñado como un inhibidor de quinasa para la clínica oncológica, tuvo un efecto potente en el receptor beta adrenérgico. Esta actividad era no deseada a la vista de la indicación pretendida y permitió abandonar este compuesto. Estudios posteriores mostraron que este compuesto era de hecho cardiotoxico, validando de este modo la utilidad de la invención y de las interacciones proteína-proteína proporcionadas en el presente documento y los procedimientos para su uso.

Este resultado también destaca un aspecto importante y estrategia general de la presente invención que los inventores denominan una "estrategia de modulación de ruta" (Figura 14A). Muchas rutas celulares tienen baja actividad en un estado basal o no estimulado, pero pueden activarse con uno o más agonistas o activadores. Si una célula se trata en primer lugar con un compuesto de ensayo y después se trata con un agonista o activador, puede determinarse la capacidad del compuesto de ensayo para bloquear la activación de ruta. Este es el caso para el compuesto candidato estudiado en la Figura 15B, que bloqueó el receptor beta adrenérgico; un efecto que sólo pudo verse en presencia de isotroterenol. (En ausencia de isotroterenol, esta ruta está completamente cerrada, como se muestra en la imagen superior izquierda de la Figura 15B). Además, pudieron verse agentes que bloquean la ruta dependiente de TNF tratando con el agente y después estimulando células con TNF (Figura 12).

La estrategia de modulación de ruta se ejemplifica adicionalmente en la Figura 14B, en la que se trataron células con compuestos de ensayo (fármacos) y después con camptotecina. La camptotecina (CPT) induce daño de ADN durante un período de tiempo, e induce diversas interacciones en rutas de respuesta a daño, como se muestra en las imágenes de la Figura 14B. La evaluación de los efectos de diversos compuestos en presencia de CPT permitió la detección de agentes que bloqueaban los efectos de CPT o potenciaban los efectos de CPT. Algunos de estos efectos eran deseados o no deseados dependiendo del contexto. Por ejemplo, están en desarrollo inhibidores de quinasas de punto de control para su uso en la clínica oncológica junto con agentes de daño de ADN. Para tales agentes, se desean efectos sinérgicos con CPT y pueden detectarse con esta estrategia. Taxol y terfenadina activaron muchas de estas rutas, como se muestra en la matriz. Por el contrario, geldanamicina, 17-AAG y Y27632 tuvieron efectos opuestos en varias de estas rutas.

Como se muestra en la Figura 14B, la terfenadina activó varias rutas de respuesta a daño de ADN de una manera similar a la hallada para paclitaxel (taxol) un agente antineoplásico conocido y eficaz. Esto impulsó una evaluación de las actividades antiproliferativas potenciales de terfenadina. Los estudios de terfenadina en una línea celular de carcinoma de próstata mostraron que, de forma coherente con su perfil farmacológico como se determina en el presente documento, tenía una actividad antiproliferativa (datos no mostrados). Por lo tanto, la realización de perfiles farmacológicos de fármacos conocidos de acuerdo con la presente invención puede usarse para identificar

rápidamente nuevos usos potenciales, indicaciones y combinaciones de fármacos conocidos para agentes terapéuticos humanos. Esto se consigue realizando perfiles farmacológicos con un fármaco conocido y comparando el perfil resultante con el de otros agentes con propiedades terapéuticas conocidas. Si el agente de ensayo tiene un perfil similar al de un agente con un perfil conocido/deseado entonces el agente de ensayo puede evaluarse en ensayos funcionales para determinar si tiene las mismas funciones que el fármaco comparador.

Mientras que algunas rutas celulares están inactivadas en el estado basal pero pueden activarse tratando células con agonistas de ruta, otras rutas celulares pueden estar activadas en el estado basal pero pueden inactivarse tratando las células con antagonistas o inhibidores. Por ejemplo, Akt está concentrado en la membrana, y Akt1:Pdk1 está activado, en células HEK293 cultivadas en presencia de suero, como se muestra por la señal de membrana robusta para Akt1:Pdk1 en estado basal (Figura 8C panel izquierdo). Por lo tanto, las células que expresan Akt1:Pdk1 podrían tratarse con antagonistas o inhibidores, tales como wortmanina o Ly294002, junto con el agente de ensayo de interés. Si el agente de ensayo es capaz de invertir el efecto del antagonista o inhibidor entonces restauraría la señal de Akt1:Pdk1 al estado de membrana (basal). La invención posibilita por lo tanto el tratamiento de células con un compuesto de ensayo de interés junto con otro agente. El agente adicional (modulador de ruta) puede aplicarse antes, después o simultáneamente con la aplicación del compuesto de ensayo de interés, determinándose el protocolo óptimo de forma empírica para cada ruta y ensayo. Se apreciará por un experto en la materia que la estrategia de modulación de ruta para realización de perfiles farmacológicos es un componente único de la invención que no se limita a la medición de una interacción proteína-proteína sino que puede aplicarse a otras mediciones de actividad de ruta, incluyendo como la cantidad o localización subcelular de cualquier proteína individual o de su estado de modificación post-traducciona.

Un experto en la materia se dará cuenta que la proteína quinasa, Akt1, experimenta el mismo patrón de redistribución subcelular en respuesta a wortmanina o Ly294002 como observaron los inventores para el complejo Akt1:PDK1. Por lo tanto, pueden usarse ensayos capaces de medir la localización y redistribución subcelular de Akt como alternativa a ensayos que miden la localización subcelular y redistribución del complejo Akt1:Pdk1. Están disponibles en el mercado ensayos para la redistribución de Akt de Biolumage (Dinamarca) y pueden usarse en realización de perfiles farmacológicos junto con la presente invención. De forma similar, pueden usarse ensayos para la redistribución de la subunidad p65 del complejo NFkappaB junto con la presente invención, como alternativa a la medición del complejo p50:p65, y proporcionará resultados sustancialmente similares. Tales ensayos están disponibles de Biolumage, en el que el ensayo se basa en la expresión de una proteína p65 marcada con GFP, o de Cellomics Inc, en el que el ensayo se basa en inmunofluorescencia con un anticuerpo específico de p65. En un ejemplo final, la localización subcelular de beta arrestina se desplaza a los endosomas en respuesta a agonistas y antagonistas beta adrenérgicos; estos ensayos se conocen como ensayos TransFluor (Norak/Molecular Devices) y pueden usarse como una alternativa a la medición del receptor: complejo de arrestina mostrado en la Figura 15A. La presente invención posibilita el uso de paneles de ensayo de alto contenido para realización de perfiles farmacológicos y tales paneles pueden incluir ensayo de alto contenido para la redistribución de proteínas individuales además de ensayos de alto contenido o alto rendimiento para complejos proteicos o interacciones.

La presente invención también aborda varias limitaciones de estrategias de realización de perfiles farmacológicos previamente usadas tales como microplacas génicas. Una característica de la invención es la capacidad para capturar efectos tanto a corto plazo como a largo plazo en múltiples puntos dentro de una ruta. Parte de las dinámicas de ensayo observadas fueron respuestas a actividades celulares funcionales o secundarias, tales como apoptosis o progresión del ciclo celular, particularmente en los puntos temporales más largos (8 horas o 16 horas), mientras que los puntos temporales más cortos informan sobre efectos más inmediatos de los compuestos. Explorando señalización en múltiples puntos temporales, y en múltiples niveles dentro de las jerarquías de ruta, los inventores pueden identificar cambios que implican directamente o cercanos a la diana de interés.

Son necesarios enfoques tales como este para clarificar los papeles funcionales y bioquímicos de proteínas particulares, y para identificar las dianas más prometedoras para el desarrollo de agentes terapéuticos humanos. Una exclusión rápida de compuestos con efectos deletéreos potenciales (la denominada estrategia "a prueba de fallos") es igualmente importante. Además, el entendimiento de la naturaleza bioquímica específica de la actividad fuera de diana permitiría el refinamiento de una estructura química para abordar atributos funcionales deseables o no deseables de una molécula. La estrategia descrita en el presente documento proporciona un medio eficaz para marcar compuestos para exclusión de estudios posteriores, o para redirigir el desarrollo a otras áreas terapéuticas.

Se hace referencia a las siguientes patentes y publicaciones:

US 6.372.431 Cunningham, y col.

US 6.801.859 Friend, y col.

US 6.673.554 Kauvar, y col.

US 6.270.964 Michnick, y col.

US 6.294.330 Michnick, y col.

US 6.428.951 Michnick, y col.



- Solicitud de Patente de Estados Unidos 20030108869 Michnick, y col.  
 Solicitud de Patente de Estados Unidos 20020064769 Michnick, y col.  
 US 6.342.345 Blau, y col.  
 US 5.891.646 Barak, y col.  
 5 US 6.110.693 Barak, y col.  
 US 6.518.021 Thastrup, y col.  
 US 5.583.217 Quante, y col.  
 US 5.516.902 Quante, y col.  
 US 5.514.561 Quante, y col.  
 10 US 5.338.843 Quante, y col.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., y Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270, 27489-27494.
- 15 Anderson, K. E., Coadwell, J., Stephens, L. R., y Hawkins, P. T. (1998). Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. *Curr Biol* 8, 684-691.
- Angers y col., 2000, Detection of beta-2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 3684-3689.
- 20 Arlander, S. J., Eapen, A. K., Vroman, B. T., McDonald, R. J., Toft, D. O., y Karnitz, L. M. (2003). Hsp90 inhibition depletes Chk1 and sensitizes tumor cells to replication stress. *J Biol Chem* 278, 52572-52577.
- Basso, A. D., Solit, D. B., Chiosis, G., Giri, B., Tsihchlis, P., y Rosen, N. (2002). Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *J Biol Chem* 277, 39858-39866.
- 25 Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., y col. (2004). A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97-105.
- 30 Brazil, D. P., Park, J., y Hemmings, B. A. (2002). PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell* 11 1, 293-303.
- Daaka, Y., Luttrell, L. M., y Lefkowitz, R. J. (1997). Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 390, 88-91.
- 35 Dai, K., Kobayashi, R., y Beach, D. (1996). Physical interaction of mammalian CDC37 with CDK4. *J Biol Chem* 271, 22030-22034.
- 40 de Ruiter, N. D., Wolthuis, R. M., van Dam, H., Burgering, B. M., y Bos, J. L. (2000). Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. *Mol Cell Biol* 20, 8480-8488.

- Dempsey, P. W., Doyle, S. E., He, J. Q., y Cheng, G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14, 193-209.
- Diehl, J. A., Zindy, F., y Sherr, C. J.(1997). Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 11, 957-972.
- Fry, D. W., Kraker, A. J., McMichael, A., Ambroso, L. A., Nelson, J. M., Leopold, W. R., Connors, R. W., and Bridges, A. J. (1994). A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* 265, 1093-1095.
- 10 Galarneau, A., Primeau, M., Trudeau, L.-E. y Michnick, S.W. (2002). A Protein fragment Complementation Assay based on TEM1  $\beta$ -lactamase for detection of protein-protein interactions. *Nat Biotechnol*, 20: 619-622.
- Gardner, O. S., Dewar, B. J., Earp, H. S., Samet, J. M., y Graves, L. M. (2003). Dependence of peroxisome proliferator-activated receptor ligand-induced mitogen-activated protein kinase signaling on epidermal growth factor receptor transactivation. *J Biol Chem* 278, 46261-46269.
- 15 Giaever, G., Flaherty, P., Kumm, J., Proctor, M., Nislow, C., Jaramillo, D. F., Chu, A. M., Jordan, M. I., Arkin, A. P., y Davis, R. W. (2004). Chemogenomic profiling: identifying the functional interactions of small molecules in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 793-798.
- 20 Giaever, G., Shoemaker, D. D., Jones, T. W., Liang, H., Winzeler, E. A., Astromoff, A., y Davis, R. W. (1999). Genomic profiling of drug sensitivities via induced haploinsufficiency. *Nat Genet* 21, 278-283.
- Gong, L., Li, Y., Nedeljkovic-Kurepa, A., y Sarkar, F. H. (2003). Inactivation of NF-kappaB by genistein is mediated via Akt signaling pathway in breast cancer cells. *Oncogene* 22, 4702-4709.
- 25 Hong, S., Lee, H. Y., Lee, Y. W., y Lee, H. W. (2000). Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res* 60, 6068-6074.
- Hanke, J. H., Gardner, J. P., Dow, R. L., Changelian, P. S., Brissette, W. H., Weringer, E. J., Pollok, B. A., y Connelly, P. A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lckand FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271, 695-701.
- Hazra, S., Xiong, S., Wang, J., Rippe, R. A., Krishna, V., Chatterjee, K., y Tsukamoto, H. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 279, 11392-11401.
- 35 Hu, E., Kim, J. B., Sarraf, P., y Spiegelinan, B. M. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* 274, 2100-2103.
- 40 Huang J, Z. H., Haggarty SJ, Spring DR, Hwang H, Jin F, Snyder M, Schreiber SL (2004). Finding new components of the target ofrapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips. *ProcNatlAcad-SciUSA* 101, 16594-16599.

- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., y O'Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- 5 Ihmels J, F. G., Bergmann S, Sarig O, Ziv Y, Barkai N (2002). Revealing modular organization in the yeast transcriptional network. *NatGenet* 31, 370-377.
- Irukayama-Tomobe, Y., Miyauchi, T., Sakai, S., Kasuya, Y., Ogata, T., Takanashi, M., Iemitsu, M., Sudo, T., Goto, K., y Yamaguchi, I. (2004). Endothelin-1-induced cardiac hypertrophy is inhibited by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  partly via blockade of c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Circulation* 109, 904-910.
- 10 Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C. H., Kovacs, J. J., Higashimoto, Y., Appella, E., and Yao, T. P. (2002). MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J* 21, 6236-6245.
- 15 Kimura, Y., Rutherford, S. L., Miyata, Y., Yahara, I., Freeman, B. C., Yue, L., Morimoto, R. I., y Lindquist, S. (1997). Cdc37 is a molecular chaperone with specific functions in signal transduction. *Genes Dev* 11, 1775-1785.
- Kohn, E. A., Yoo, C. J., y Eastman, A. (2003). The protein kinase C inhibitor Go6976 is a potent inhibitor of DNA damage-induced S and G2 cell cycle checkpoints. *Cancer Res* 63, 31-35.
- 20 Kunath, T., Gish, G., Lickert, H., Jones, N., Pawson, T., y Rossant, J. (2003). Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* 21, 559-561.
- Lamphere, L., Fiore, F., Xu, X., Brizuela, L., Keezer, S., Sardet, C., Draetta, G. F., y Gyuris, J. (1997). Interaction between Cdc37 and Cdk4 in human cells. *Oncogene* 14, 1999-2004. Li, W., Zhu, T., and Guan, K. L. (2004). Transformation potential of Ras isoforms correlates with activation of phosphatidylinositol 3-kinase but not ERK. *J Biol Chem* 279, 37398-37406.
- 25 Li, Y., and Sarkar, F. H. (2002). Inhibition of nuclear factor kappaB activation in PC3 cells by genistein is mediated via Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res* 8, 2369-2377.
- 30 Lin, F. T., Chen, W., Shenoy, S., Cong, M., Exum, S. T., y Lefkowitz, R. J. (2002). Phosphorylation of betaarrestin2 regulates its function in internalization of beta(2)-adrenergic receptors. *Biochemistry* 41, 10692-10699.
- 35 Losel, R., y Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 46-56.
- Lum PY, A. C., Stepaniants SB, Cavet G, Wolf MK, Butler JS, Hinshaw JC, Garnier P, Prestwich GD, Leonardson A, Garrett-Englele P, Rush CM, Bard M, Schimmack G, Phillips JW, Roberts CJ, Shoemaker DD (2004). Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116, 121-137.
- 40 Lum, P. Y., Armour, C. D., Step aniants, S. B., Cavet, G., Wolf, M. K., Butler, J. S., Hinshaw, J. C., Gamier, P., Prestwich, G. D., Leonardson, A., y col. (2004). Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116, 121-137.

- MacLean, M., y Picard, D. (2003). Cdc37 goes beyond Hsp90 and kinases. *Cell Stress Chaperones* 8, 114-119.
- 5 Mei, S., Ho, A. D., y Mahlkecht, U. (2004). Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Revisión). *Int J Oncol* 25, 1509-1519.
- 10 Michnick, S.W., Remy, I., C.-Valois, F.X., Vallee-Belisle, A., Galarneau, A. y Pelletier, J.N. (2000) Detection of Protein-Protein Interactions by Protein Fragment Complementation Strategies, Parts A and B (John N. Abelson, Scott D Emr and Jeremy Thorner, editors) *A Volume of Methods in Enzymology*. 328, 208-230.
- Ming, X. F., Viswambharan, H., Barandier, C., Ruffieux, J., Kaibuchi, K., Rusconi, S., y Yang, Z. (2002). Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 22, 8467-8477.
- 15 Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., y Koutsilieris, M. (2004). The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 235-256.
- Muhlenbeck, F., Haas, E., Schwenzler, R., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., Scheurich, P., y Wajant, H. (1998). TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. *J Biol Chem* 273, 33091-33098.
- 20 Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., y Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20, 87-90.
- 25 Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K., y Milburn, M. V. (1998). Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 395, 137-143.
- Ochel, H. J., Schulte, T. W., Nguyen, P., Trepel, J., y Neckers, L. (1999). The benzoquinone ansamycin geldanamycin stimulates proteolytic degradation of focal adhesion kinase. *Mol Genet Metab* 66, 24-30.
- 30 Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., y Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem* 277, 21843-21850.
- 35 Park, A., y Baichwal, V. R. (1996). Systematic mutational analysis of the death domain of the tumor necrosis factor receptor 1-associated protein TRADD. *J Biol Chem* 271, 9858-9862.
- Parsons AB, B. R., Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone C (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *NatBiotechnol*
- 40 22, 62-69.
- Pelletier, J. N., Campbell-Valois, F. X., y Michnick, S. W. (1998). Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12141-12146.

- Pelletier, J.N., Remy, I. y Michnick, S.W. (1998). Protein-Fragment Complementation Assays: a General Strategy for the in vivo Detection of Protein-Protein Interactions. *Journal of Biomolecular Techniques*, 10: 32-39.
- 5 Perdew, G. H., Wiegand, H., Vanden Heuvel, J. P., Mitchell, C., y Singh, S. S. (1997). A 50 kilodalton protein associated with raf and pp60(v-src) protein kinases is a mammalian homolog of the cell cycle control protein cdc37. *Biochemistry* 36, 3600-3607.
- Perlman, Z. E., Slack, M. D., Feng, Y., Mitchison, T. J., Wu, L. F., and Altschuler, S. J. (2004). Multidimensional drug  
10 profiling by automated microscopy. *Science* 306, 1194-1198.
- Phelan, M. L., y Nock, S. (2003). Generation of bioreagents for protein chips. *Proteomics* 3, 2123-2134:
- Picard, D. (2002). Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cell Mol Life Sci* 59, 1640-1648.  
15
- Pruitt, K., y Der, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett* 171, 1-10.
- Remy, I., Wilson, I.A. and Michnick, S.W. (1999). Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 283: 990-993.
- 20 Remy, I., y Michnick, S. W. (2001). Visualization of biochemical networks in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7678-7683.
- Remy, I., y Michnick, S. W. (2003). Dynamic visualization of expressed gene networks. *J Cell Physiol* 196, 419-429.
- 25 Remy, I., y Michnick, S. W. (2004). Regulation of apoptosis by the Ftl protein, a new modulator of protein kinase B/Akt. *Mol Cell Biol* 24, 1493-1504.
- Remy, I., Montmarquette, A., and Michnick, S. W. (2004). PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 6, 358-365.
- 30 Remy, I. y Michnick, S.W. (1999). Clonal Selection and In Vivo Quantitation of Protein Interactions with Protein Fragment Complementation Assays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 5394-5399.
- Remy, I., Pelletier, J.N., Galarneau, A. y Michnick, S.W. (2002). Protein Interactions and Library Screening with Protein Fragment Complementation Strategies. *Protein-protein interactions: A molecular cloning manual* E.A. Golemis, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 25, 449-475.  
35
- Richman, T. J., Sawyer, M. M., y Johnson, D. I. (1999). The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J Biol Chem* 274, 16861-16870.
- 40 Rodriguez-Viciano, P., Sabatier, C., and McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol* 24, 4943-4954.
- Rossi, y col., Monitoring protein-protein interactions in intact eukaryotic cells by beta-galactosidase complementation,

Proc Natl Acad Sci USA 94: 8405-8410, 1997; y documento US 6.342.345

5 Rühr y col., 1999, Cyclic AMP-dependent protein kinase binding to A-kinase anchoring proteins in living cells by fluorescence resonance energy transfer of green fluorescent protein fusion proteins, *J. Biol. Chem.* 274: 33092-33096)

Schmid, J.A., y col. (2000) Dynamics of NF $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$  studied with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *J. Biol. Chem.* 275 (22): 17035-17042.

10 Semizarov, D., Kroeger, P., y Fesik, S. (2004). siRNA-mediated gene silencing: a global genome view. *Nucleic Acids Res* 32, 3836-3845.

Shoemaker, D. D., y Linsley, P. S. (2002). Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol* 5, 334-337.

15 Stancato, L. F., Chow, Y. H., Hutchison, K. A., Perdew, G. H., Jove, R., y Pratt, W. B. (1993). Raf exists in a native heterocomplex with hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* 268, 21711-21716.

20 Sternberg, S. R. (1983). Biomedical image processing. *IEEE Computer* 16, 22-34. Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S. W., y Brisson, N. (2001). Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat Biotechnol* 19, 769-772.

Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y., y Nakamura, T. (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J Cell Biol* 147, 1519-1532.

25 Teruel, T., Hernandez, R., Benito, M., y Lorenzo, M. (2003). Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem* 278, 263-269.

30 Thevenod, F., Friedmann, J. M., Katsen, A. D., y Hauser, I. A. (2000). Up-regulation of multidrug resistance Pglycoprotein via nuclear factor- $\kappa$ B activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275, 1887-1896.

35 Varley, C. L., Stahlschmidt, J., Lee, W. C., Holder, J., Diggle, C., Selby, P. J., Trejdosiewicz, L. K., and Southgate, J. (2004). Role of PPAR $\gamma$  and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme. *J Cell Sci* 117, 2029-2036.

Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., y Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269, 5241-5248.

40 Ward, J. (1963). Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58, 236--244.

Westwick, J. K., Cox, A. D., Der, C. J., Cobb, M. H., Hibi, M., Karin, M., y Brenner, D. A. (1994). Oncogenic Ras

activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 603 0-6034.

5 Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G., y Der, C. J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* 17, 13 24-1335.

White, M. A., Nicolette, C., Minden, A., Polverino, A., Van Aelst, L., Karin, M., y Wigler, M. H. (1995). Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. *Cell* 80, 533-541.

10 Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., y col. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-682.

15 Wulf, G. M., Ryo, A., Wulf, G. G., Lee, S. W., Niu, T., Petkova, V., y Lu, K. P. (2001). Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *Embo J* 20, 3459-3472.

20 Yokoyama, Y., Tsuchida, S., Hatayama, I., y Sato, K. (1993). Lack of peroxisomal enzyme inducibility in rat hepatic preneoplastic lesions induced by mutagenic carcinogens: contrasted expression of glutathione S-transferase P form and enoyl CoA hydratase. *Carcinogenesis* 14, 393-398.

25 Yu, H., West, M., Keon, B.H., Bilter, G.K., Owens, S., Lamerdin, J., Westwick, J.K. (2003). Measuring drug action in the cellular context using protein-fragment complementation assays. *ASSAY and Drug Development Technologies* 1, 811-822.

Zabel, U., y Baeuerle, P. A. (1990). Purified human I kappa B can rapidly dissociate the complex of the NF-kappa B transcription factor with its cognate DNA. *Cell* 61, 255-265.

30 Zaccolo y T. Pozzan, 2000, Imaging signal transduction in living cells with GFP-based probes, *IUBMB Life* 49: 1-5, 2000.

Zhang, J., Ferguson, S. S., Barak, L. S., Menard, L., y Caron, M. G. (1996). Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 271, 18302-18305.

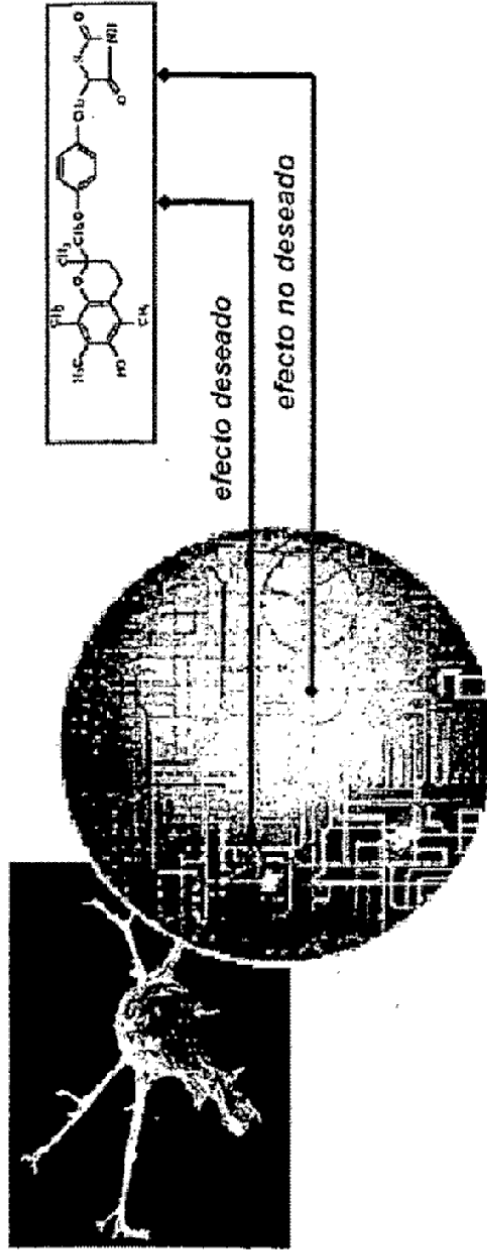
35 Aunque las muchas formas de la invención desveladas en el presente documento constituyen las realizaciones preferidas en la actualidad, son posibles muchas otras y los detalles adicionales de las realizaciones preferidas y otras realizaciones posibles no deben interpretarse como limitaciones. Se entiende que los términos usados en el presente documento son meramente descriptivos y no limitantes.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para efectuar la retirada de un compuesto de ensayo con propiedades no deseables, comprendiendo dicho procedimiento el análisis de dicho compuesto de ensayo que tiene propiedades no deseables contra un panel de ensayos de complementación de fragmentos proteicos a base de células, comprendiendo dicho panel dos o más ensayos de complementación de fragmentos proteicos de alto contenido.
2. Un procedimiento para efectuar la retirada de un compuesto de ensayo con propiedades no deseables, comprendiendo dicho procedimiento el análisis de dicho compuesto de ensayo que tiene propiedades no deseables contra un panel de ensayos de complementación de fragmentos proteicos, comprendiendo dicho panel ensayos de alto contenido para dos o más interacciones proteína-proteína.
- 10 3. El procedimiento de la reivindicación 1 ó 2, en el que el ensayo de complementación de fragmentos proteicos se usa en una célula, fluido biológico o extracto.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la célula es una línea celular, célula en cultivo, componente de un tejido intacto o animal, órgano en cultivo o un organismo vivo no humano.
- 15 5. El procedimiento de la reivindicación 3 ó 4, en el que la célula es una célula de mamífero, bacteria, levadura, planta u hongo.
6. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el organismo vivo no humano o animal es *Drosophila*, pez cebra o ratón.
- 20 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto de ensayo es una molécula sintética, producto natural, fármaco conocido o potencial, ligando, anticuerpo, péptido, ARN de interferencia pequeño o biblioteca combinatoria.



Fig. 1 Identificación de efectos en ruta y fuera de ruta de compuestos químicos, fármacos o sustancias tóxicas en células vivas



Ensayos de interacciones proteína-proteína en células

Fig. 2 Ejemplos de proteínas intracelulares que forman complejos proteicos

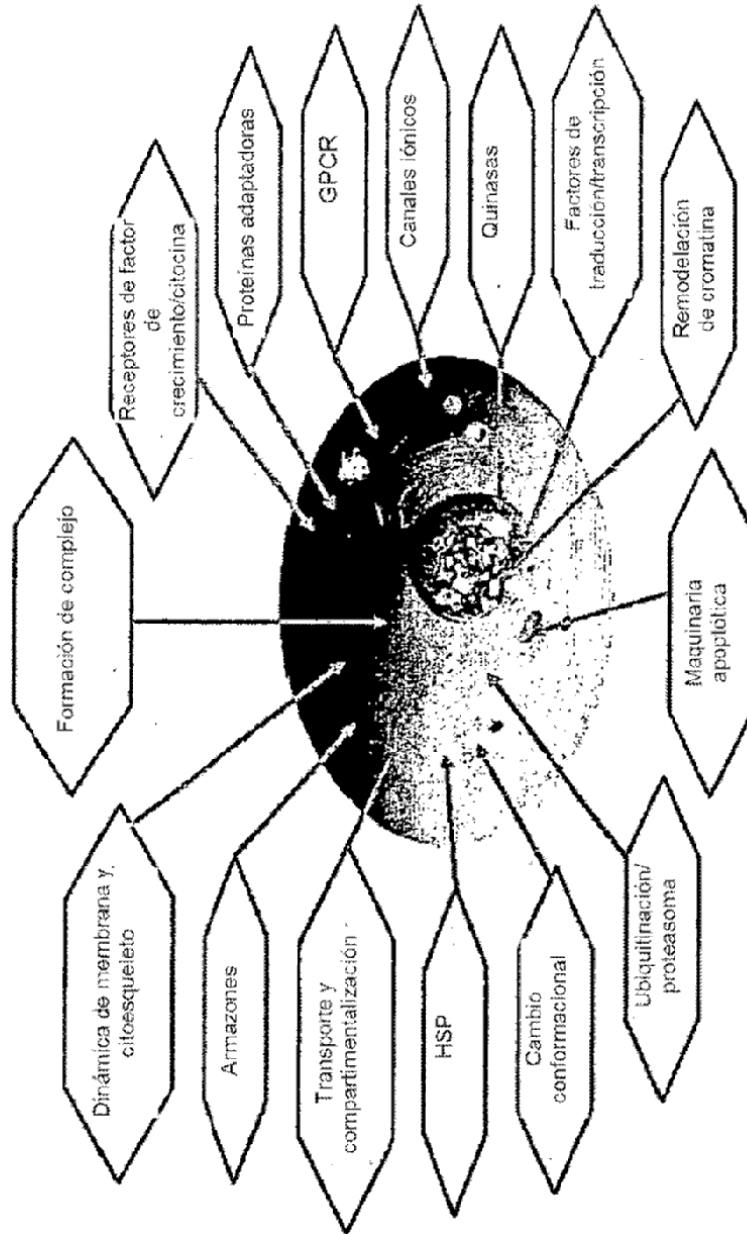
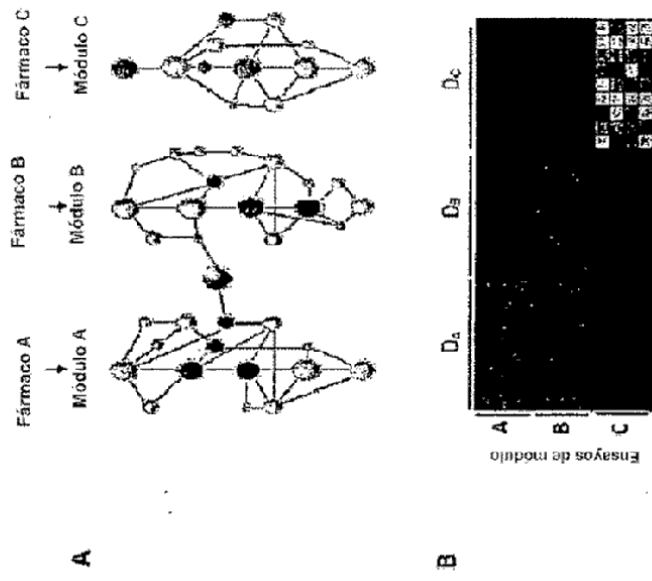


Fig. 3 Aplicación de estrategia de red para explorar efectos en ruta y fuera de ruta de los compuestos

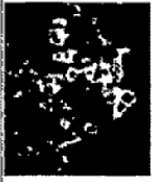


**Fig. 4** Etapas de la realización de perfiles farmacológicos

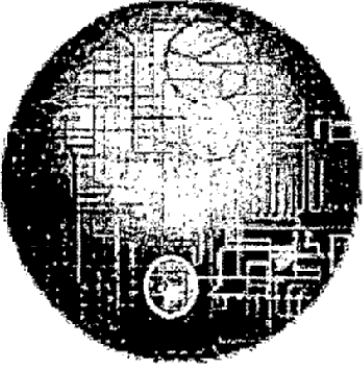
1. Seleccionar el compuesto o compuestos químicos para perfilar



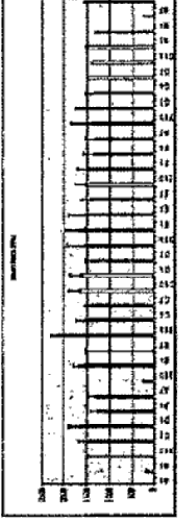
3. Construir ensayos para interacciones proteicas (centinelas)



2. Seleccionar las interacciones proteína-proteína para ensayar



4. Ensayar los efectos de cada compuesto químico en cada interacción proteica. Cuantificar los aumentos, las reducciones y/o la translocación de la señal o señales



5. Combinar los resultados obtenidos de 2 o más ensayos de interacción para establecer un perfil farmacológico para cada compuesto. Usar los perfiles para identificar actividades en ruta y fuera de ruta.




Fig. 5 Ejemplo de realización de perfiles farmacológicos en alto rendimiento

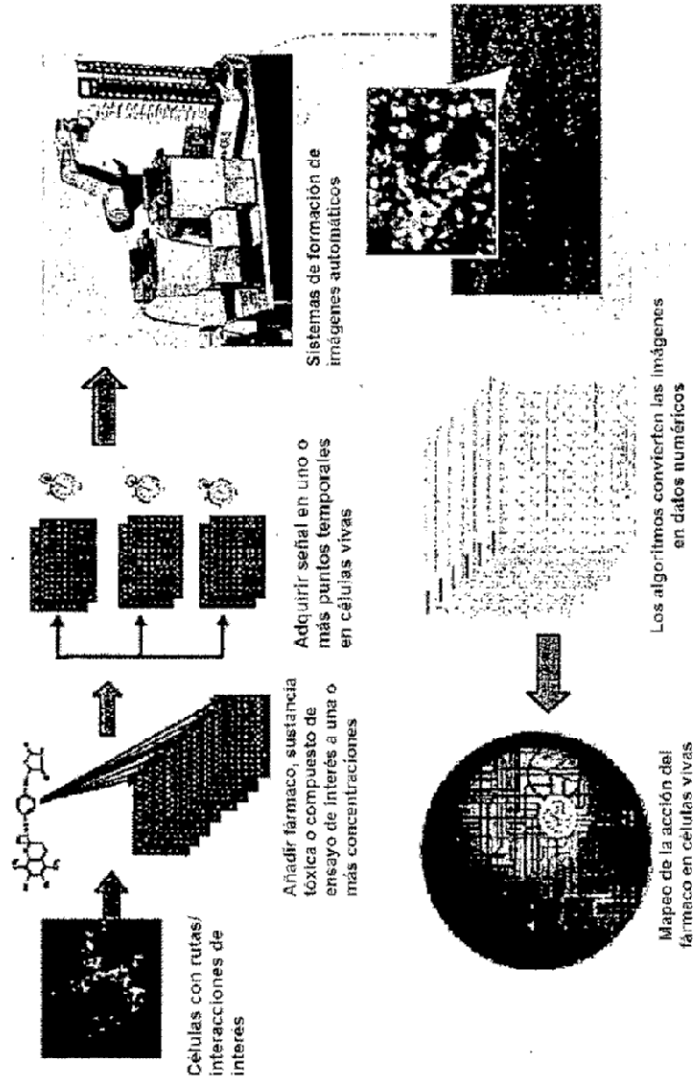


Fig. 6A. Interacciones en rutas de receptor acoplado a proteína G

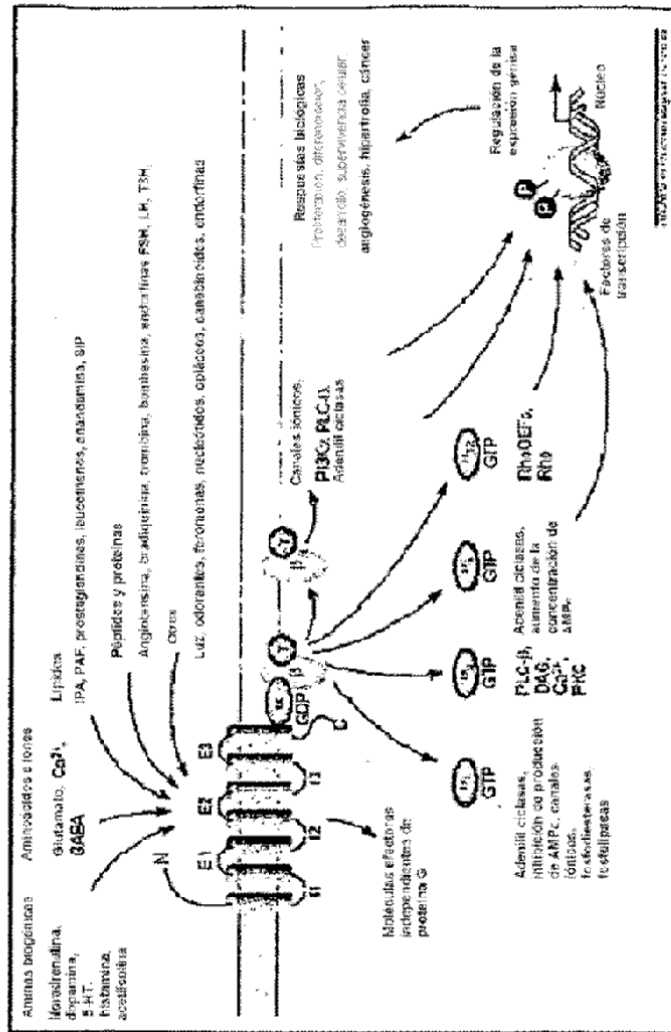


Fig. 6B. Ejemplos de interacciones proteicas en rutas GPCR

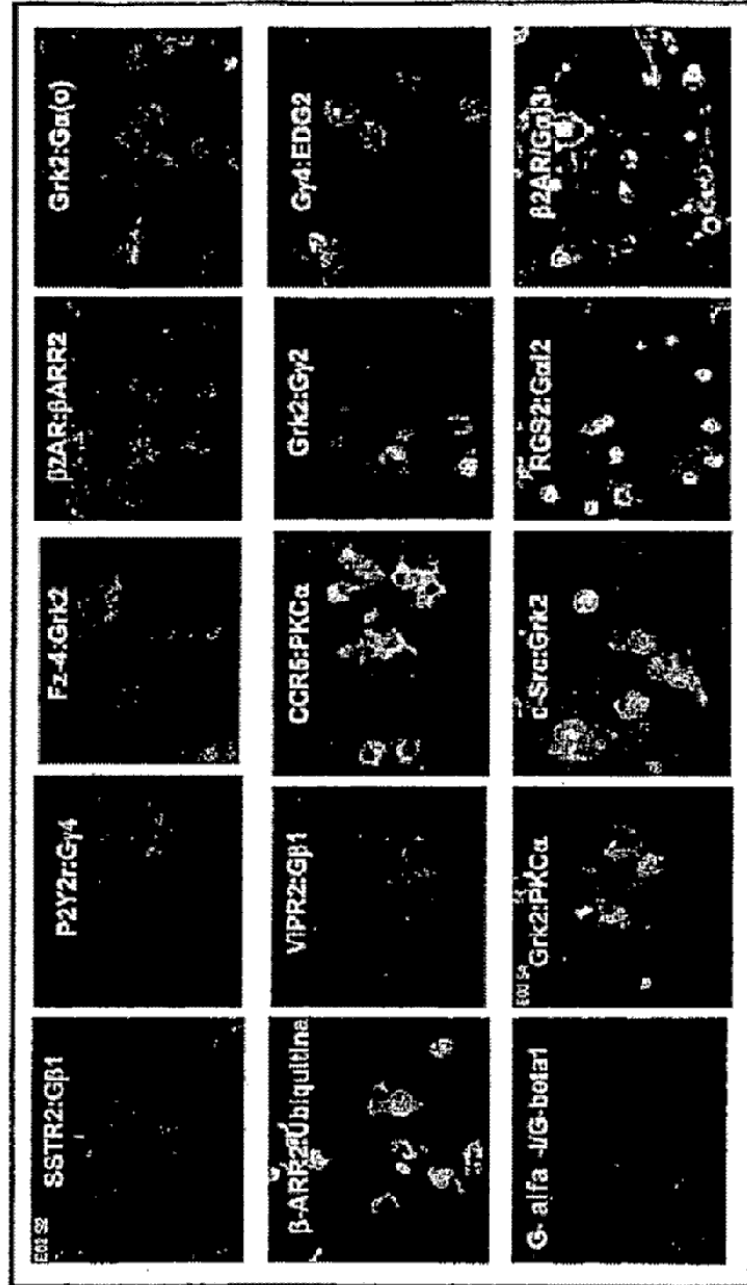


Fig. 7A. Interacciones en las rutas de ubiquitina-proteasoma y ciclo celular

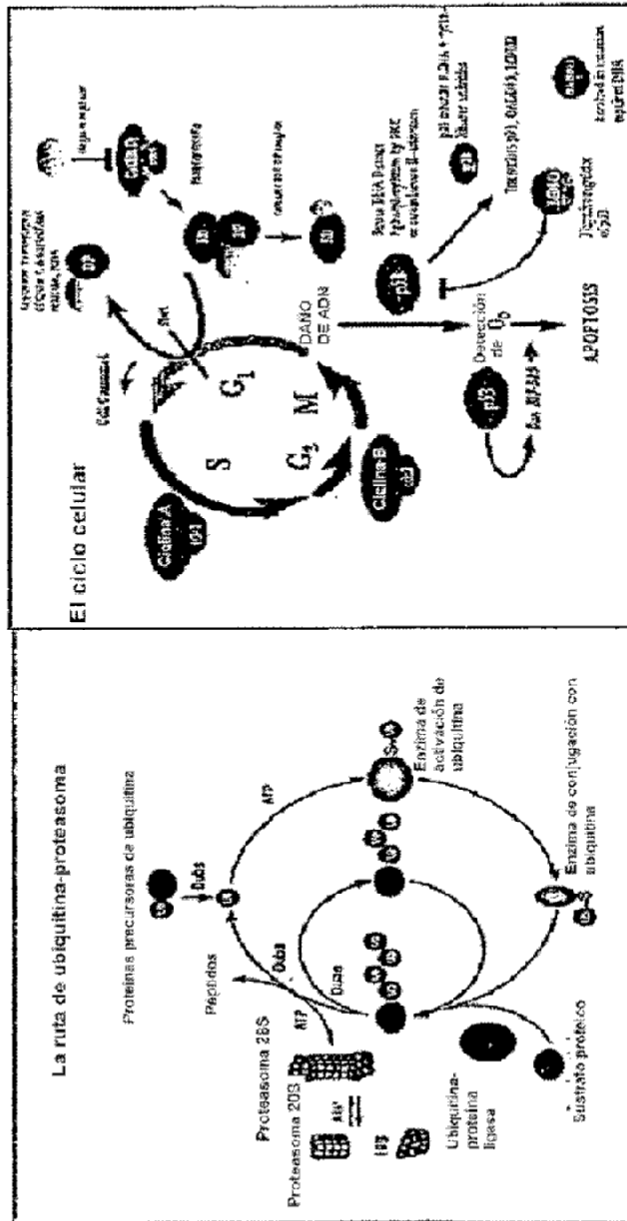




Fig. 7B. Ejemplos de interacciones en las rutas de ubiquitilación, sumoilación y proteasoma

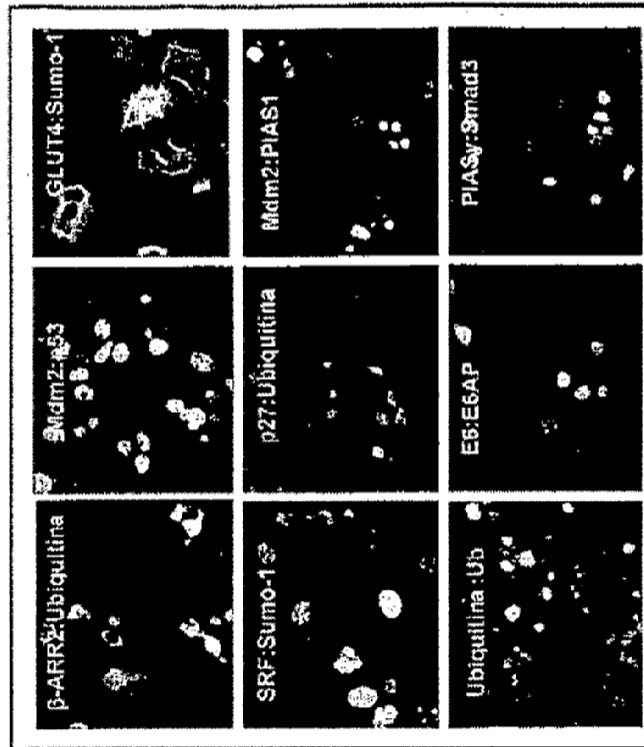


Fig. 7C. El inhibidor del proteasoma, ALLN, tiene efectos 'en ruta' en las interacciones proteicas

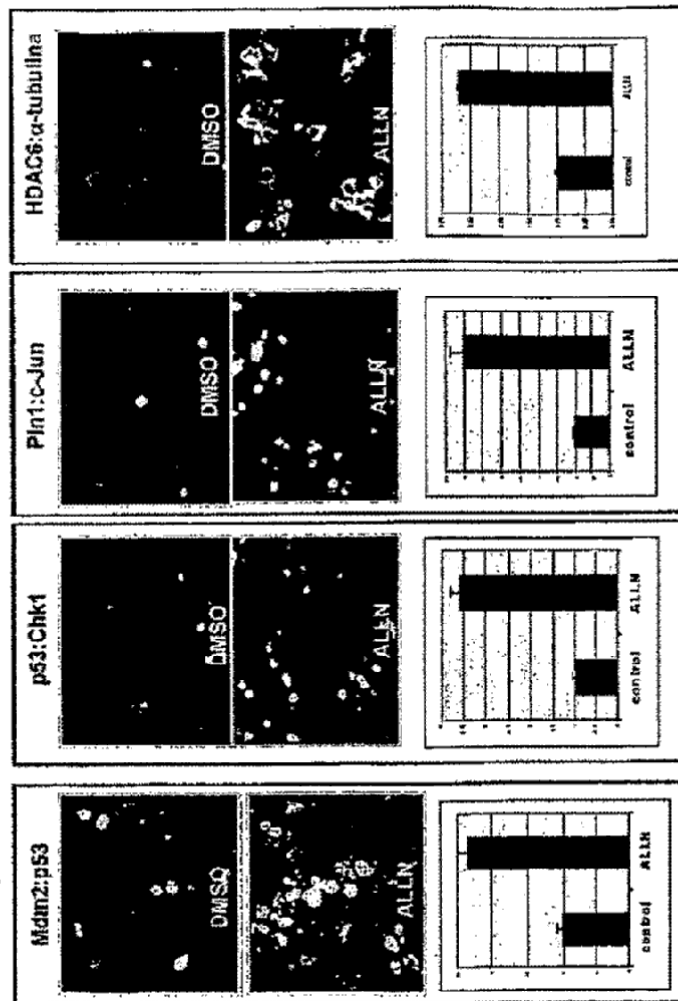


Fig. 8A. Rutas de señalización e interacciones de quinasa

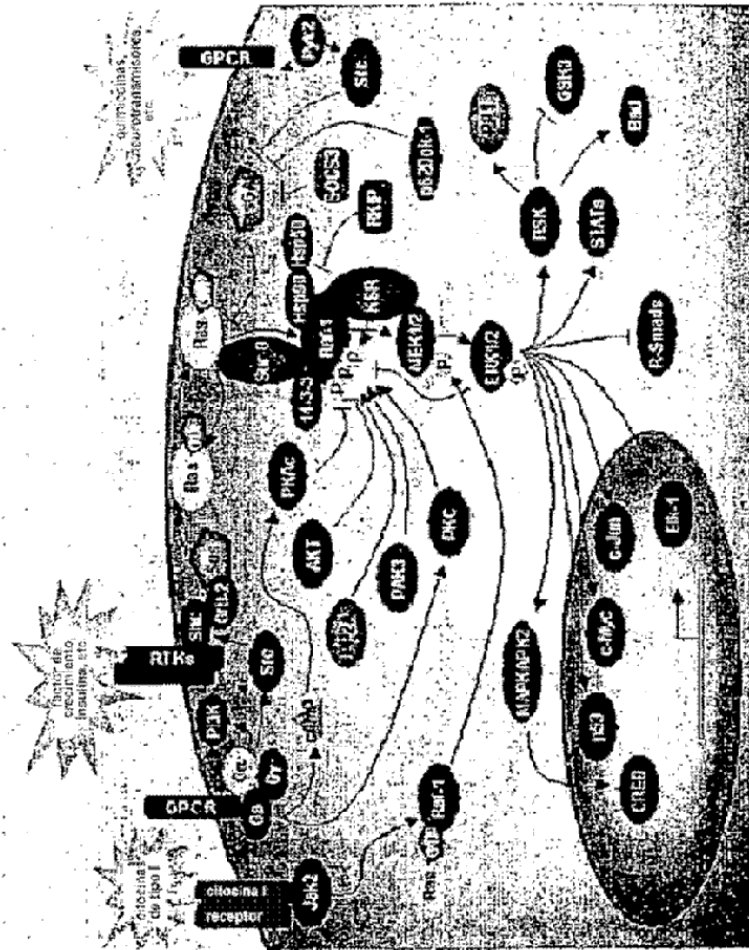


Fig. 8B. Ejemplos de interacciones que implican quinasas en células humanas

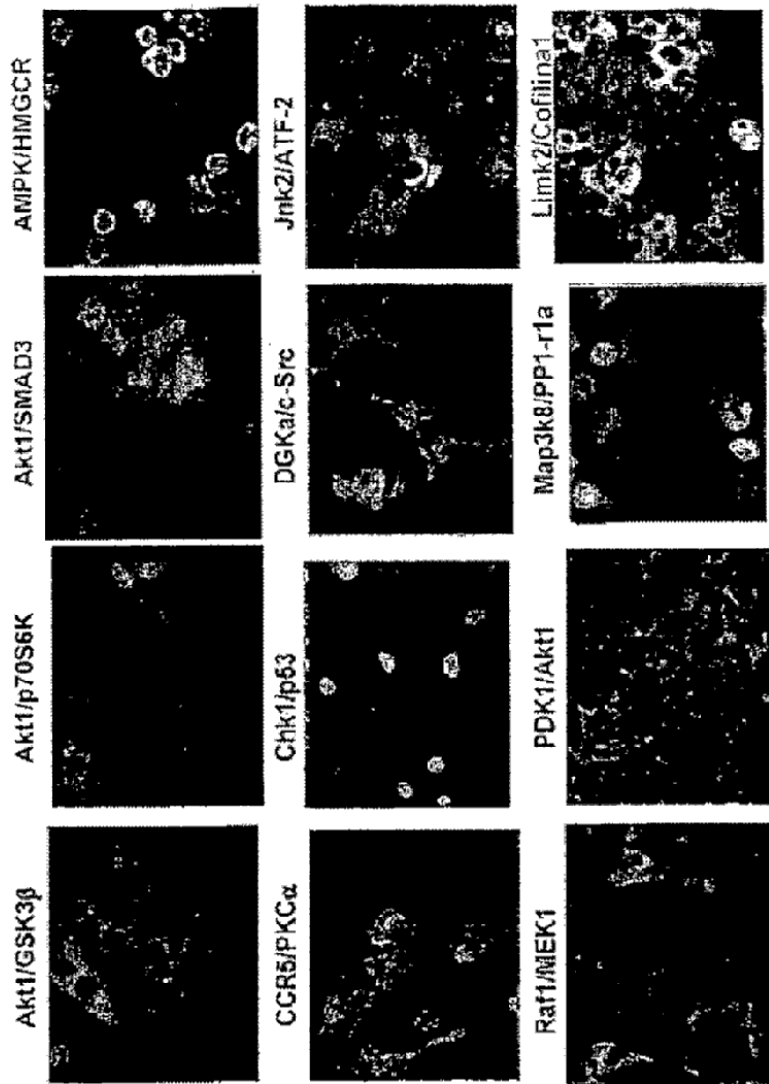


Fig. 8C. Los compuestos que actúan 'corriente arriba' tienen efectos en las interacciones de quinasas en las rutas de señalización

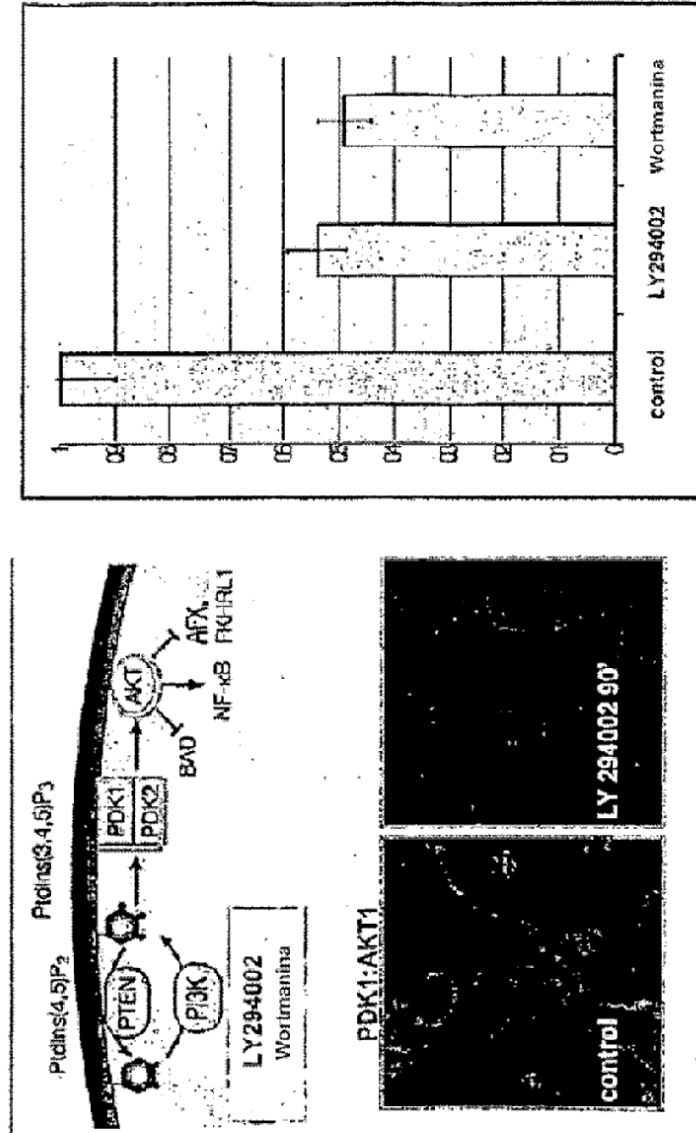


Fig. 8D. Los inhibidores que actúan 'corriente arriba' tienen efectos en las interacciones de quinasa en las rutas de señalización

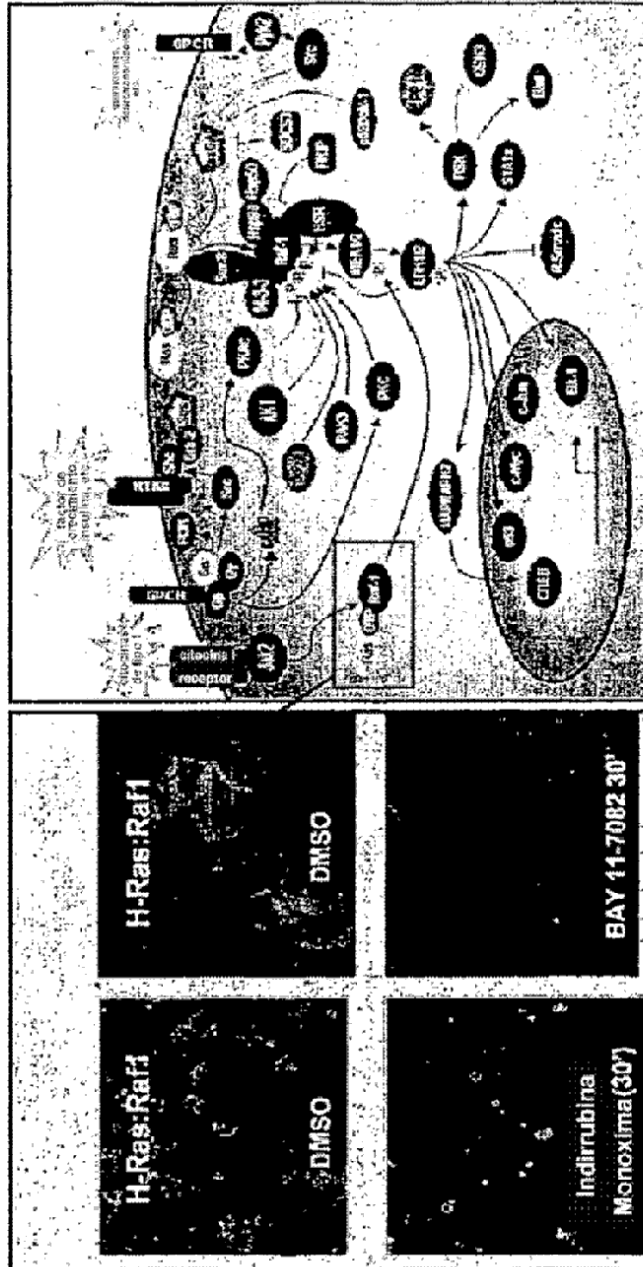


Fig. 9A. Proteínas de choque térmico, co-chaperonas y sus interacciones

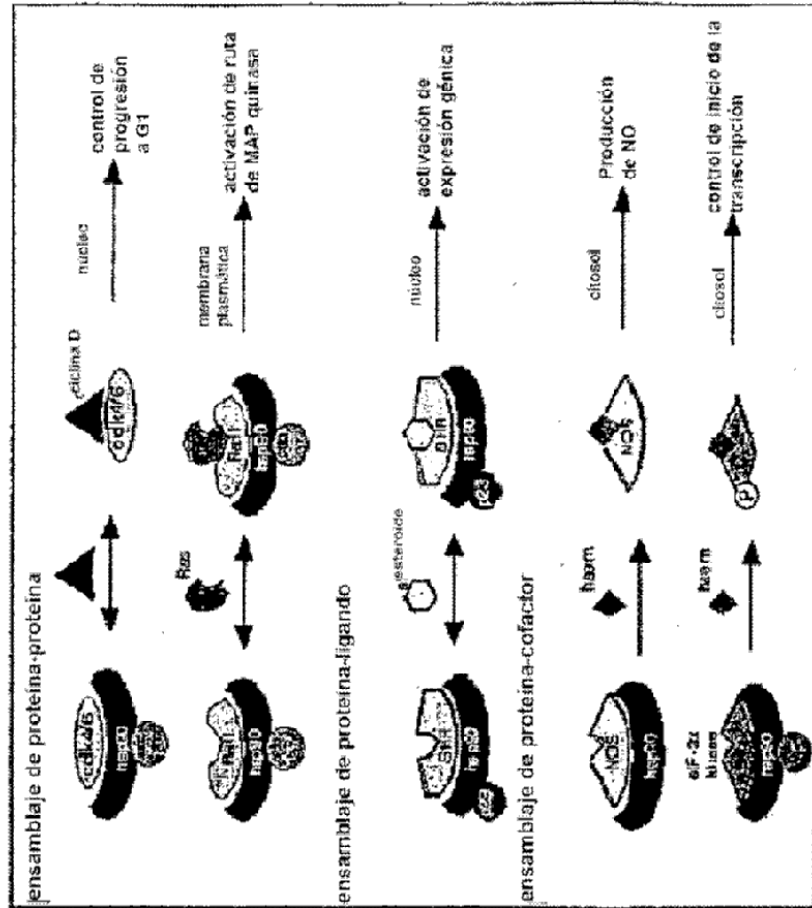


Fig. 9B. Los inhibidores de HSP provocan pérdida de complejos de proteína cliente

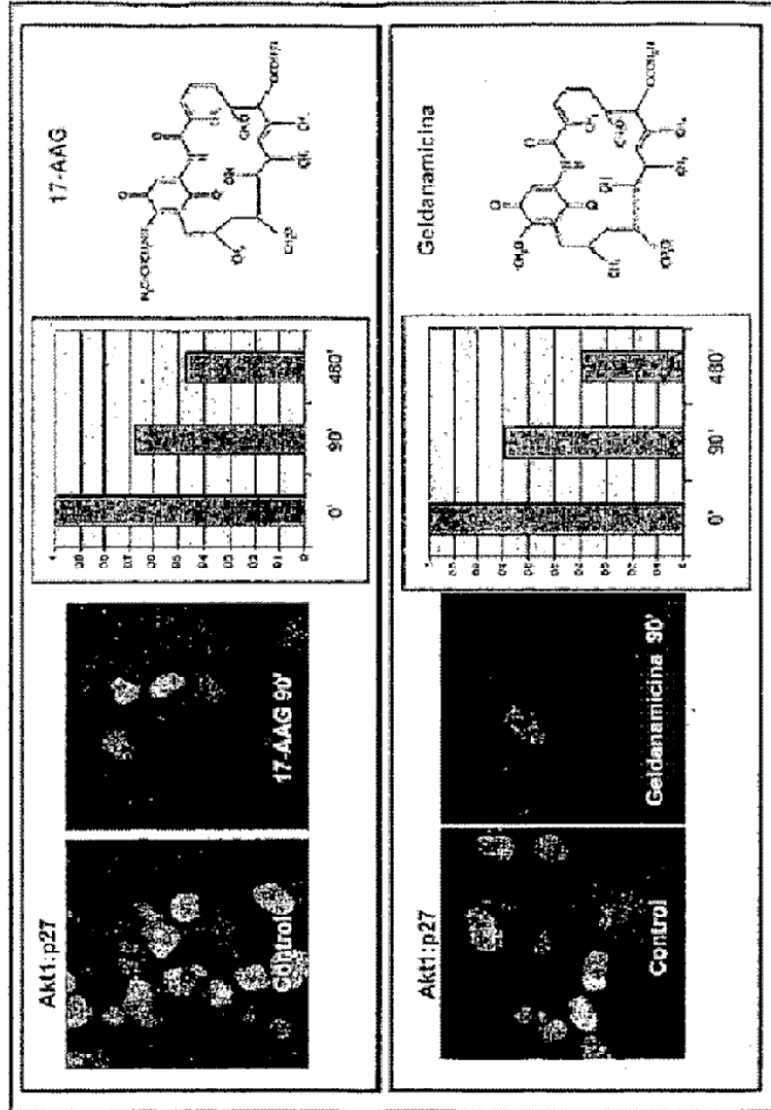
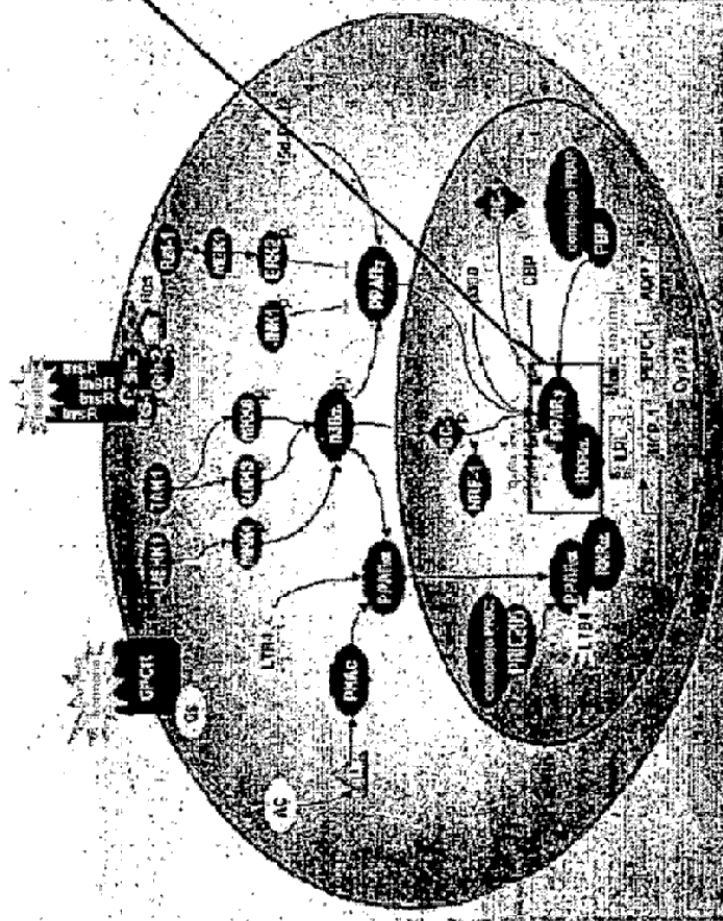




Fig. 10A. Rutas de receptor de hormonas nucleares e interacciones



El agonista conocido, rosiglitazona, induce interacciones RXR:PPAR como se muestra por las imágenes a la derecha. Otros agentes que inducen estas interacciones pueden identificarse mediante tales interacciones.

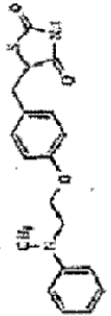
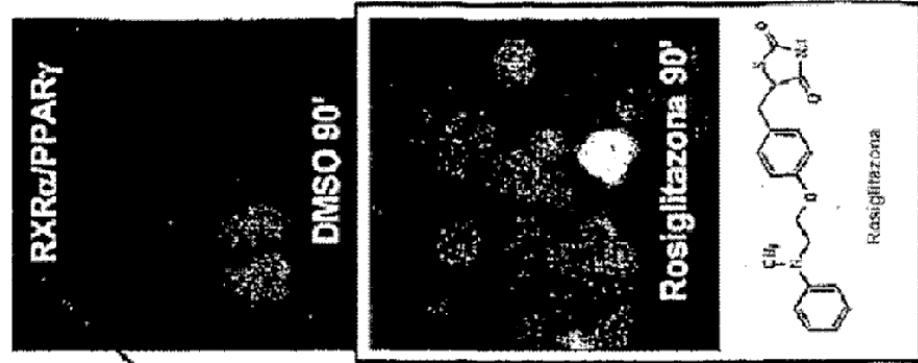


Fig. 10B. Ejemplos de interacciones que implican receptores de hormonas nucleares

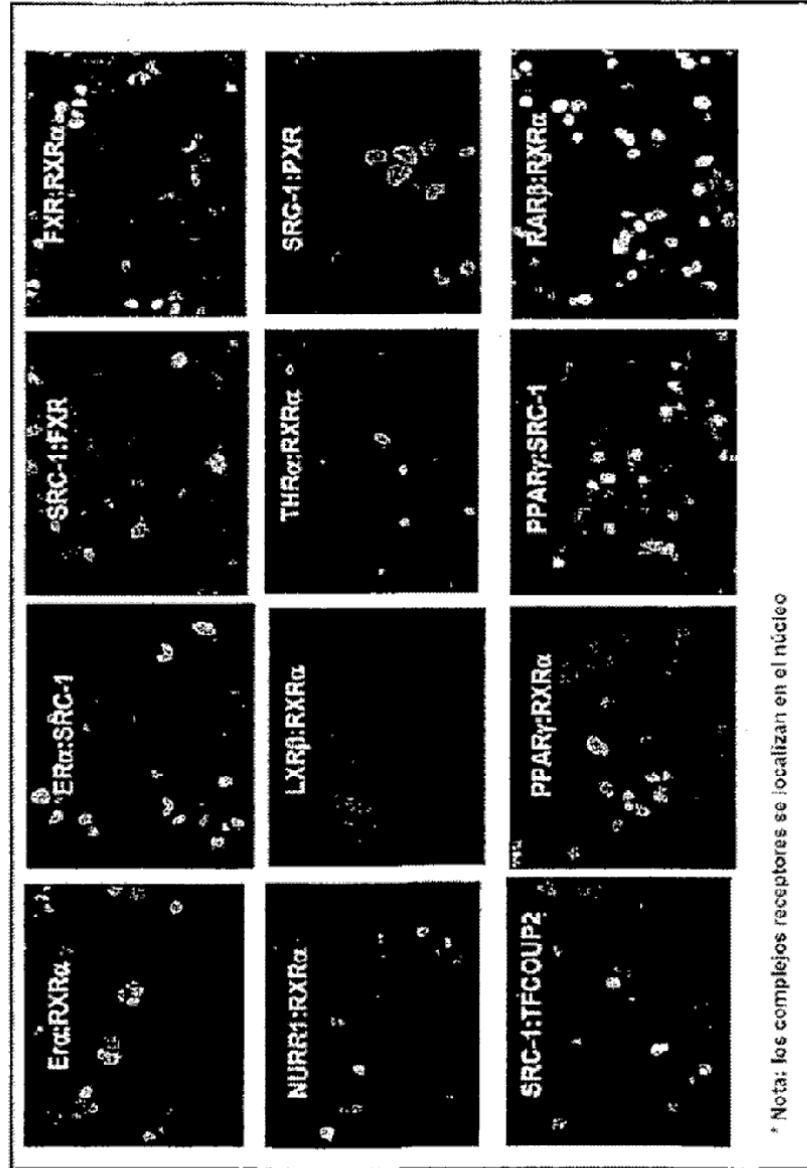


Fig. 11A. Rutas e interacciones que controlan la apoptosis

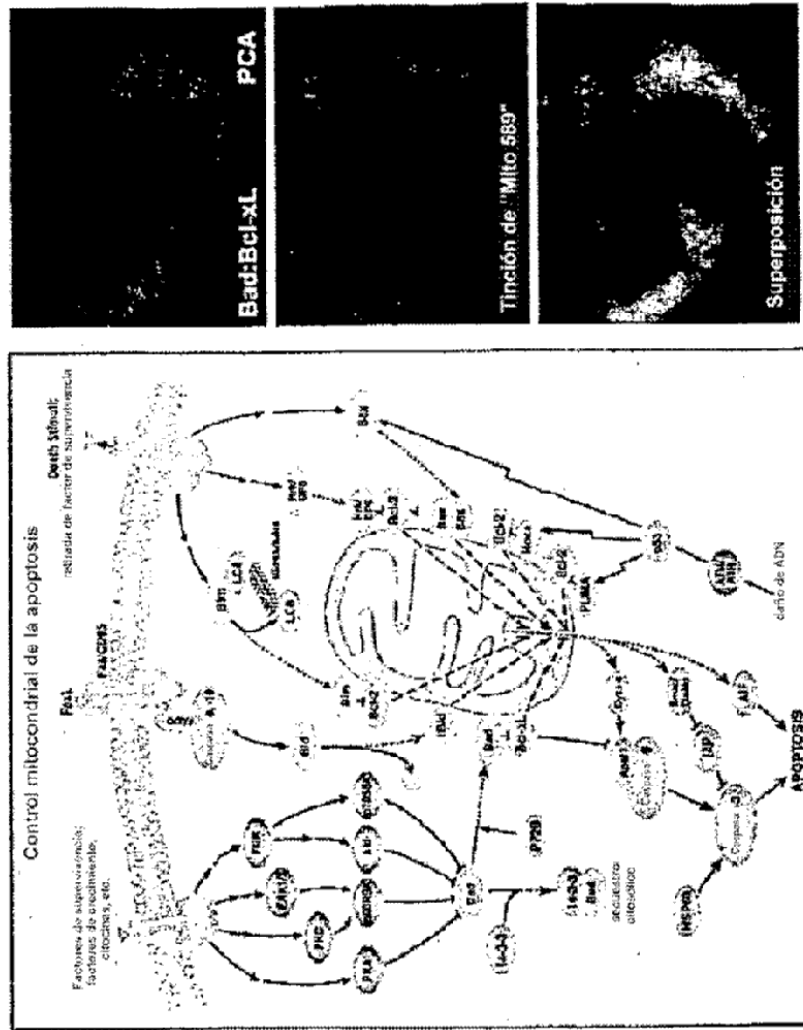


Fig. 11B. Efectos de un agente inductor de apoptosis en las interacciones proteicas

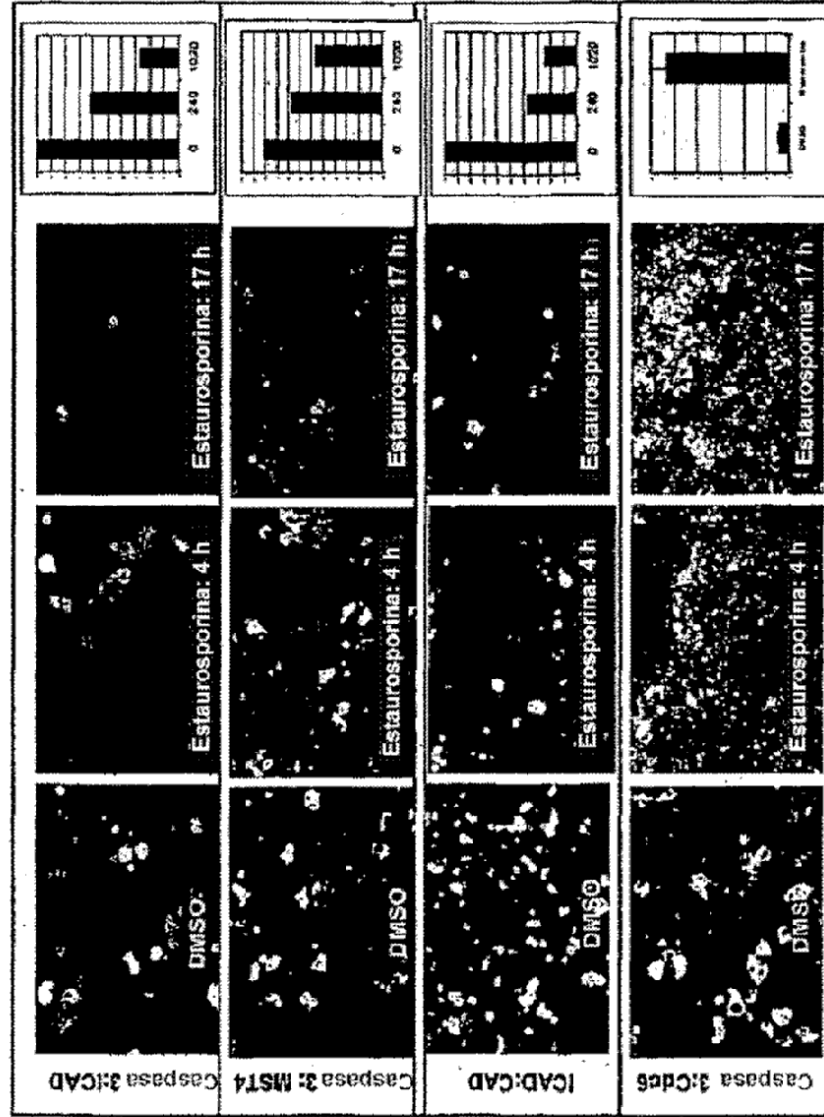


Fig. 12A, B. Ejemplos de los efectos de diferentes compuestos y fármacos en diferentes interacciones proteicas en células humanas

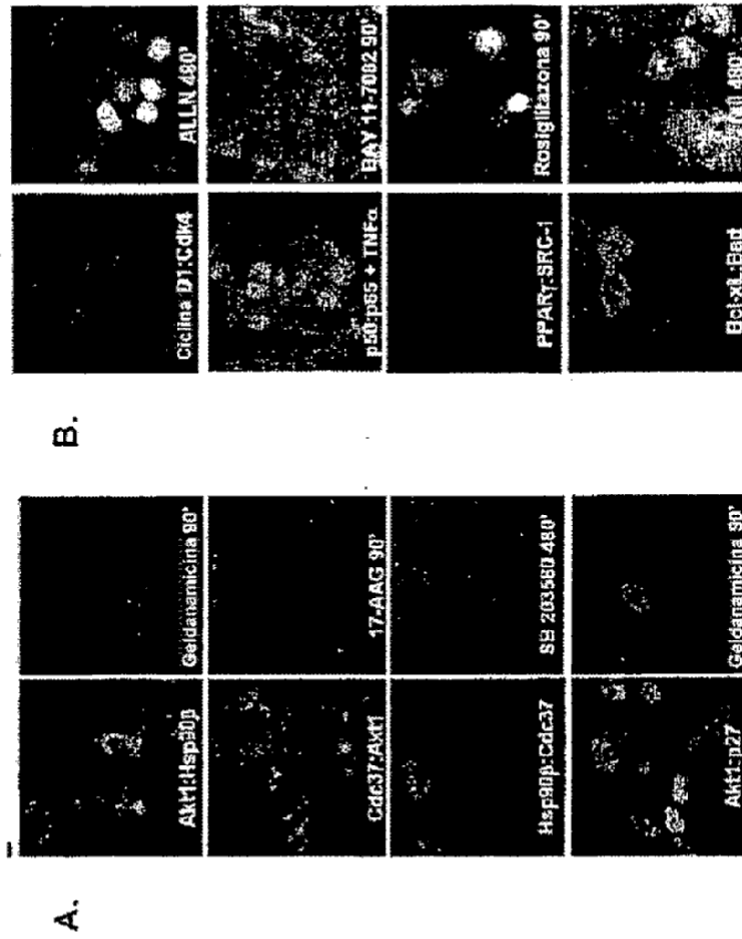


Fig. 12C, D. Ejemplos adicionales de los efectos de diferentes compuestos y fármacos en diferentes interacciones proteicas en células humanas

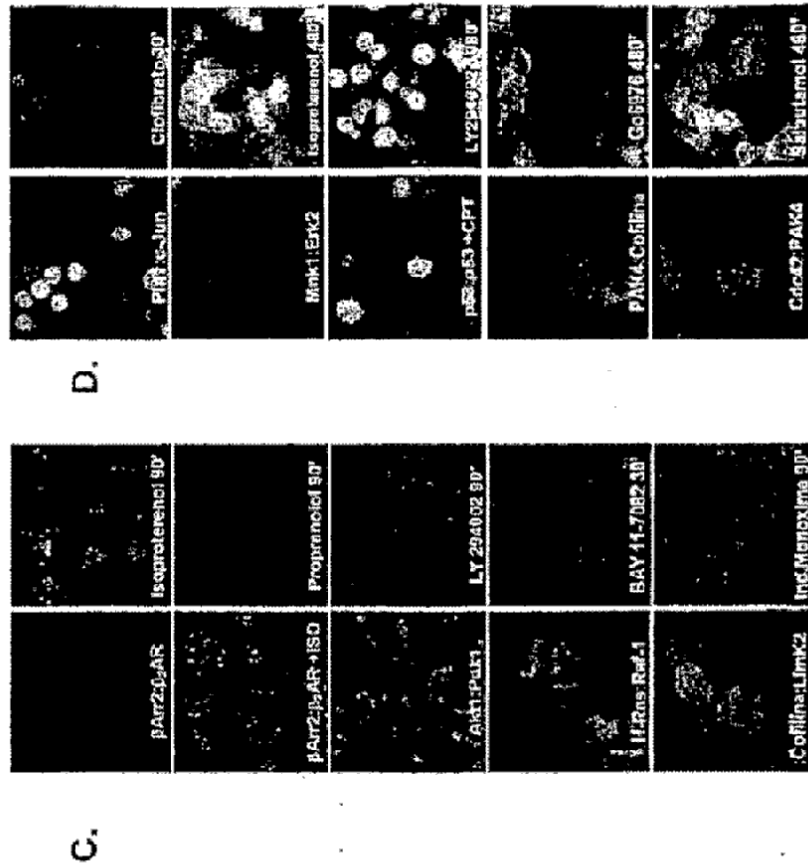


Fig. 13A. Ejemplos de perfiles farmacológicos

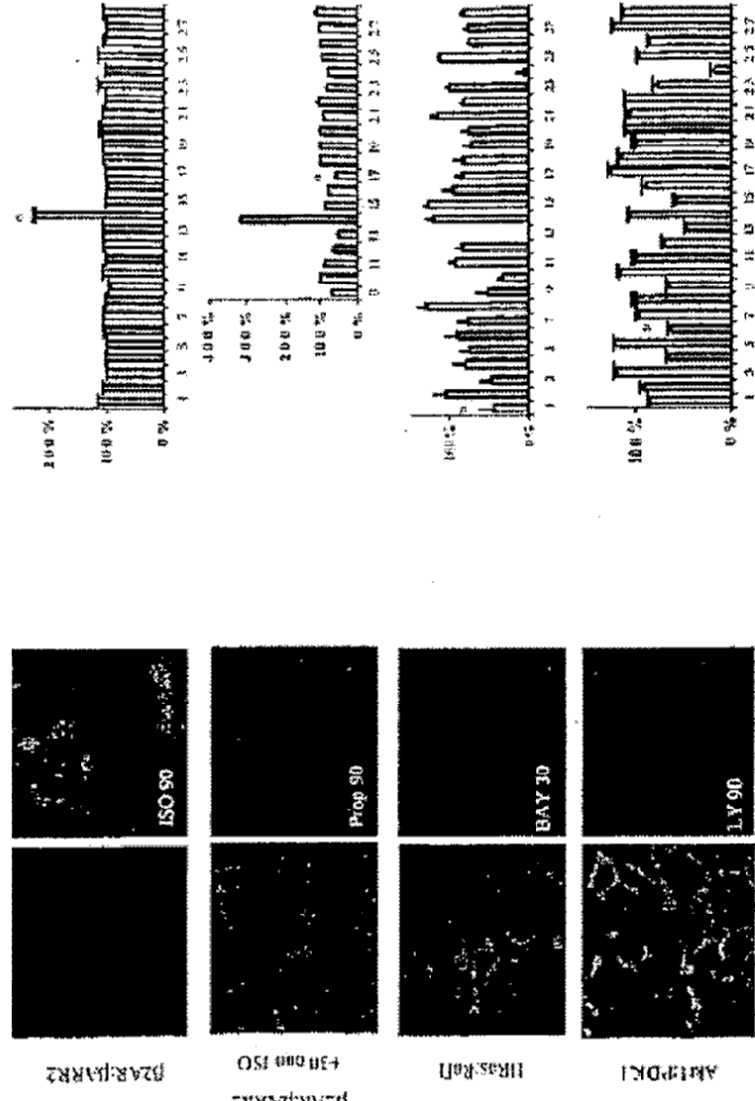


Fig. 13B. Ejemplos de perfiles farmacológicos

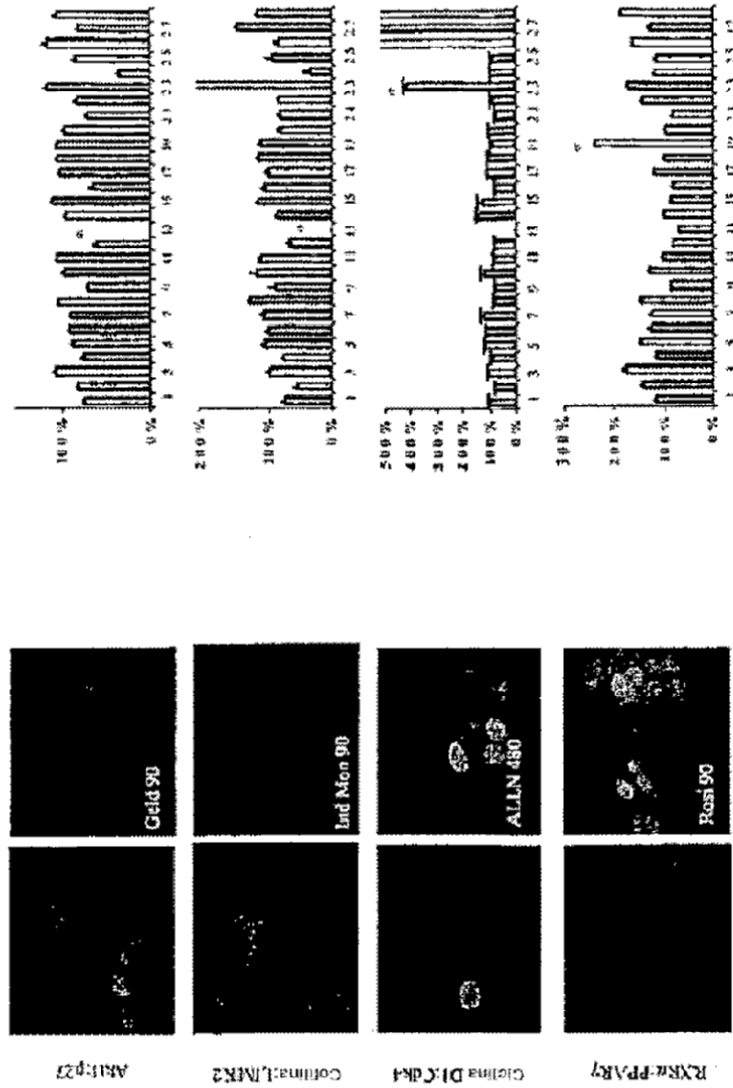
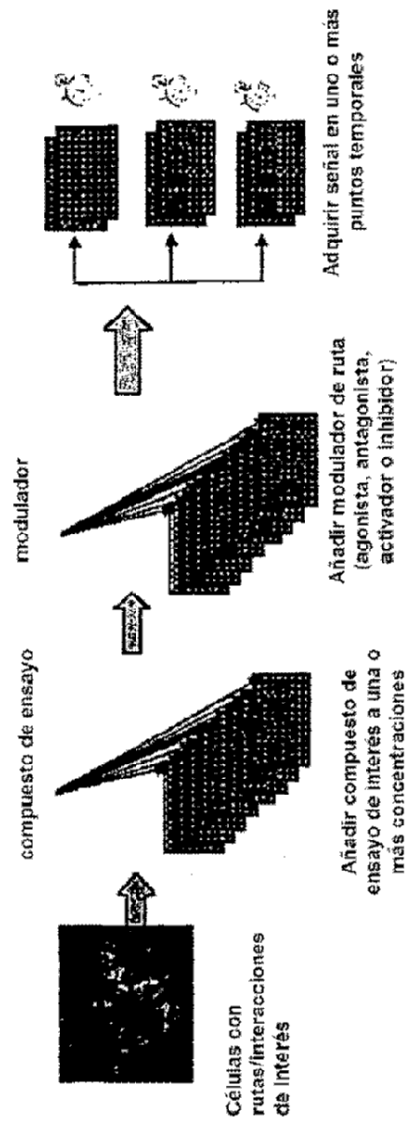


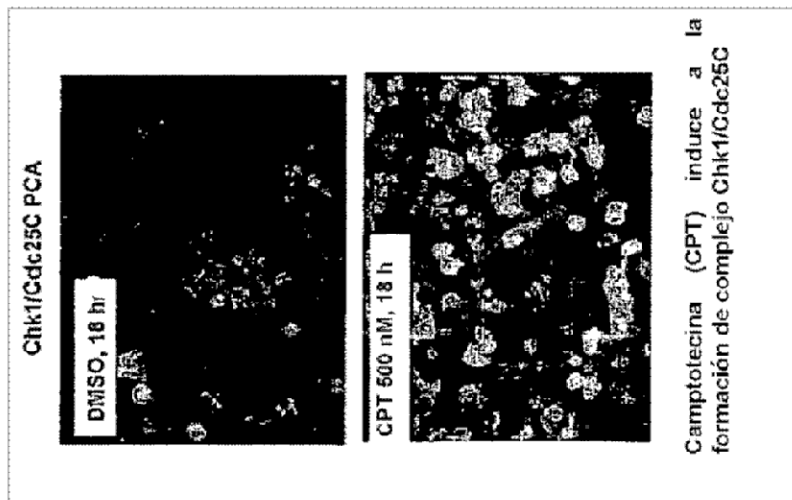


Fig. 14A. Estrategia de modulación de ruta para realización de perfiles farmacológicos. Las células se tratan con compuesto de ensayo y con un modulador de ruta



Los compuestos de ensayo que inducen o reprimen la ruta en presencia del modulador pueden identificarse con esta estrategia, como se muestra en las Figuras 14B y 15B

Fig. 14B. Estrategia de modulación de ruta para realización de perfiles farmacológicos como se ejemplifica con rutas de respuesta a daño de ADN y CPT



Ensayo	ESTim	Tiempo de ensayo	Terfenadina	Taxol	17-AAG	Geldanamicina	Y-27632
p53/p53		1080					
p53/p53	CPT	1080					
Pin1/p53		480					
Pin1/p53	CPT	1080					
Chk1/Cdc25C		480					
Chk1/Cdc25C	CPT	1080					

Los agentes que inducen o bloquean rutas que responden a CPT pueden identificarse con esta estrategia. Las células están primero con el fármaco de interés y después se tratan con CPT.

Terfenadina y taxol inducen rutas de respuesta a daño de ADN, como se evalúa con varias interacciones proteína-proteína diferentes mostradas en la matriz (verde indica aumento de la señal de ensayo).

17-AAG, Geldamicina y Y-27632 bloquean varias rutas de respuesta a daño de ADN (rojo indica reducción de la señal del ensayo)

En algunos casos (Pin1/p53), los efectos de estos agentes solo podrían detectarse en presencia de CPT

Fig. 15A. Estrategia de modulación de ruta en células humanas: las rutas las pueden inducir los agonistas y bloquearlas los antagonistas

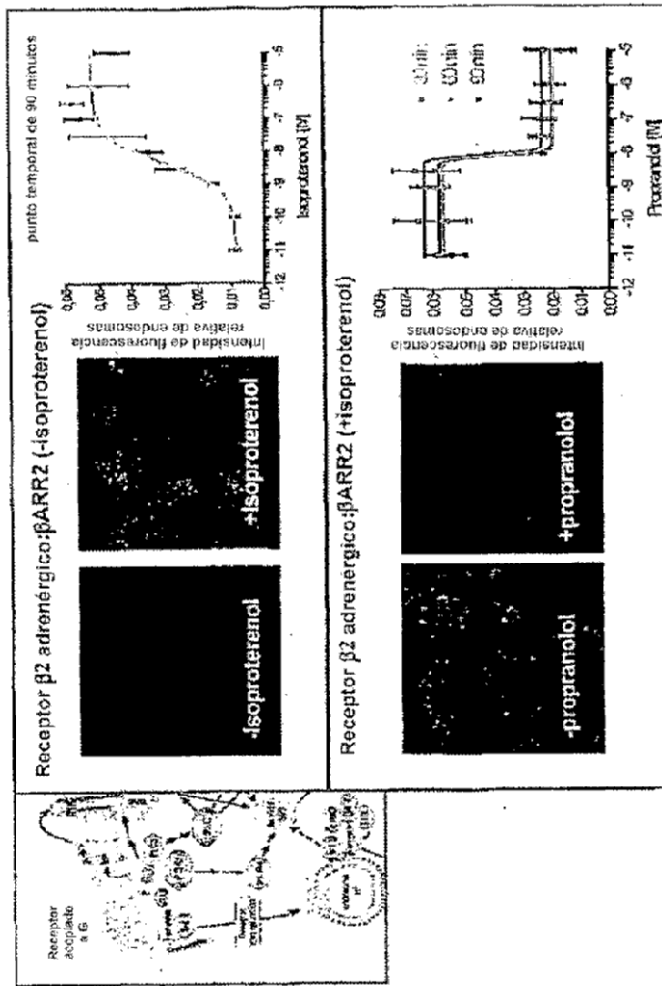


Figura 15B. Pueden detectarse los efectos no pretendidos, "fuera de ruta" de compuestos candidatos. El compuesto candidato se ensayó en presencia de isoproterenol

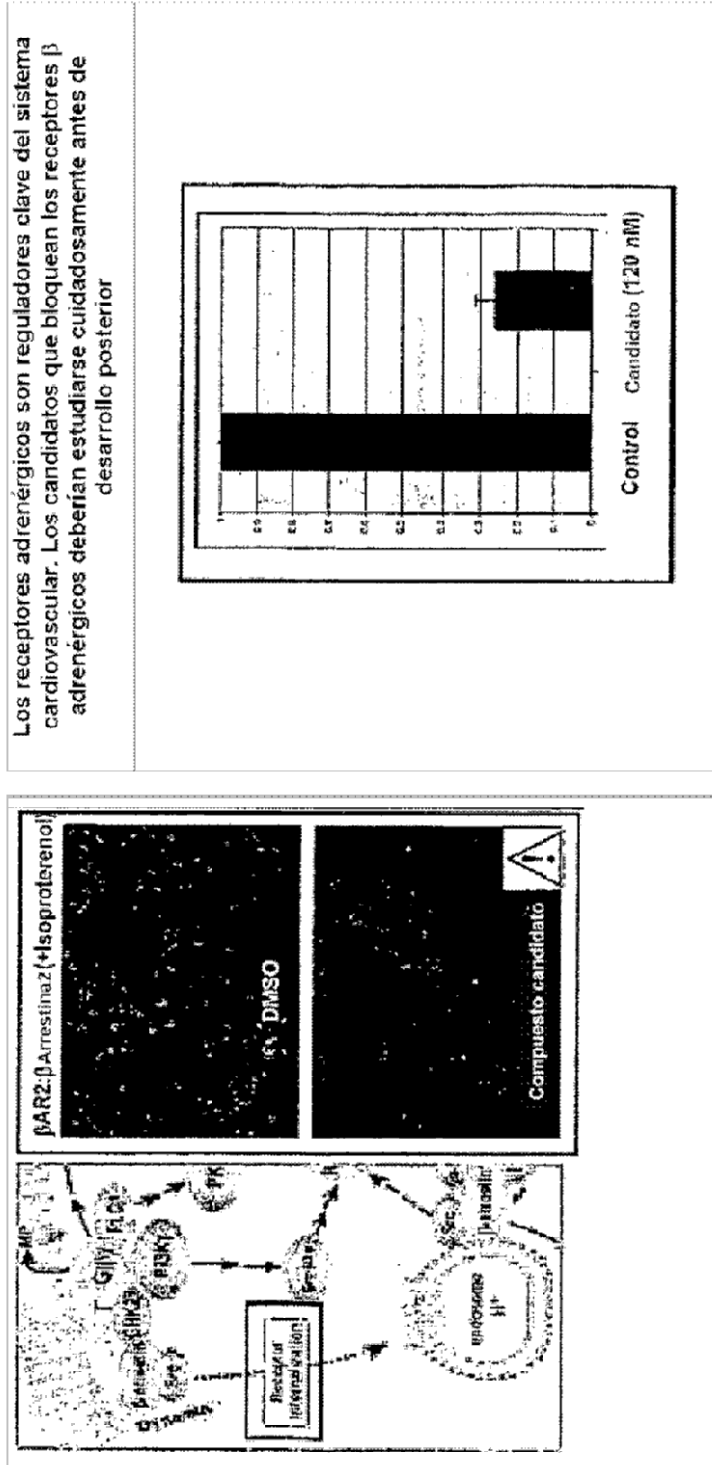


Figura 16A. Evaluación de toxicidades basadas en mecanismo con interacciones proteicas en células humanas.

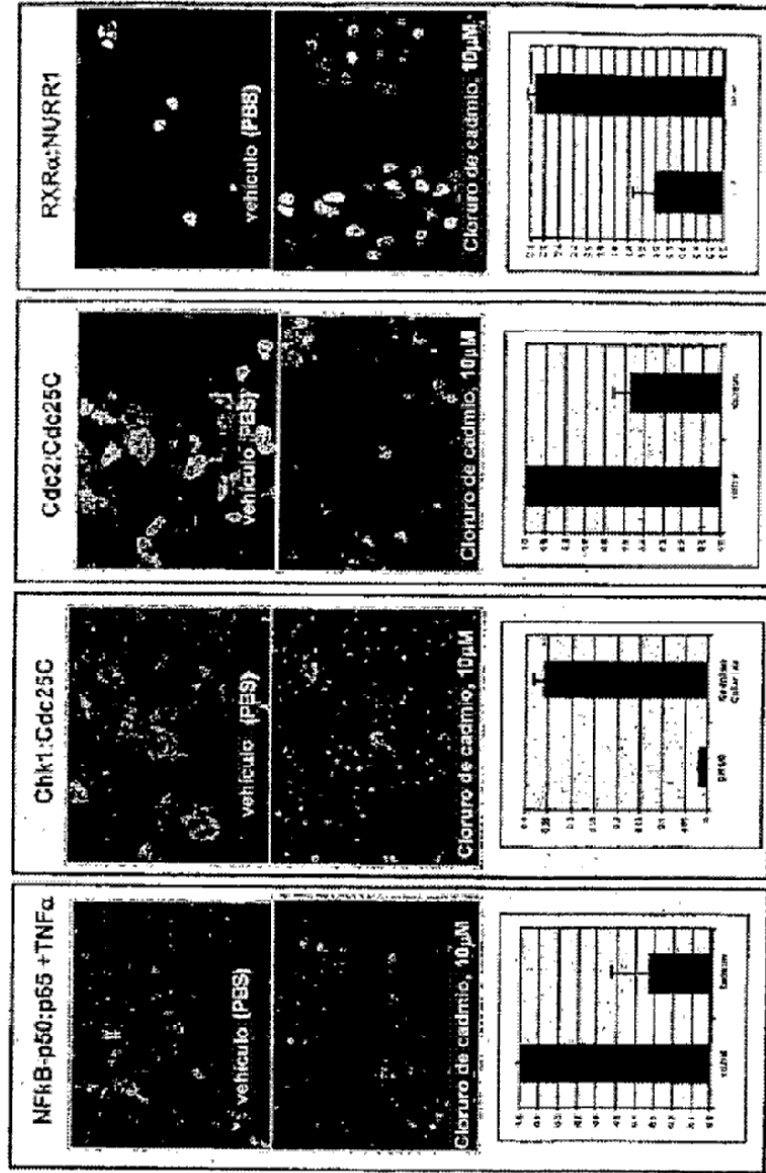




Figura 17A. Actividades de 107 fármacos conocidos en un panel de interacciones proteicas en células humanas

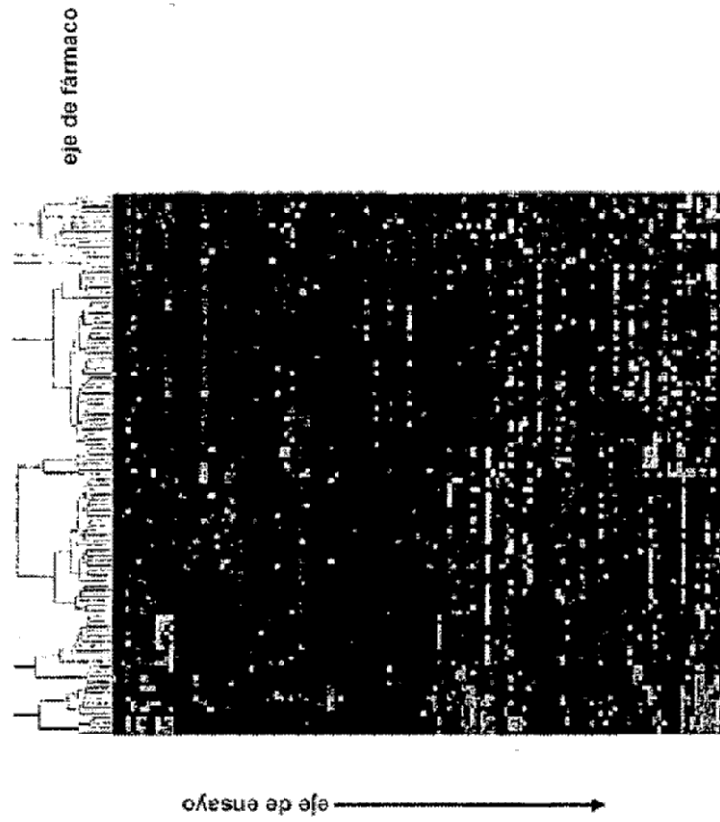


Figura 17B. Agrupamiento de fármacos conocidos por función y clase estructural cuando se realizan perfiles frente a un panel de interacciones proteicas

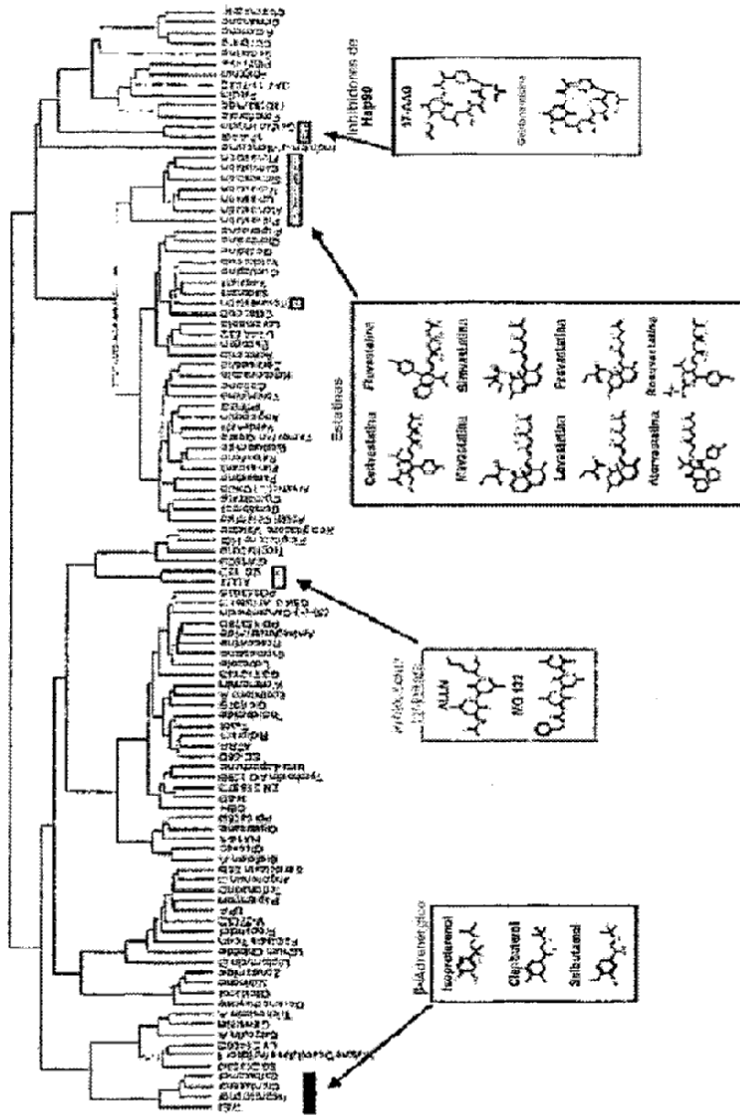
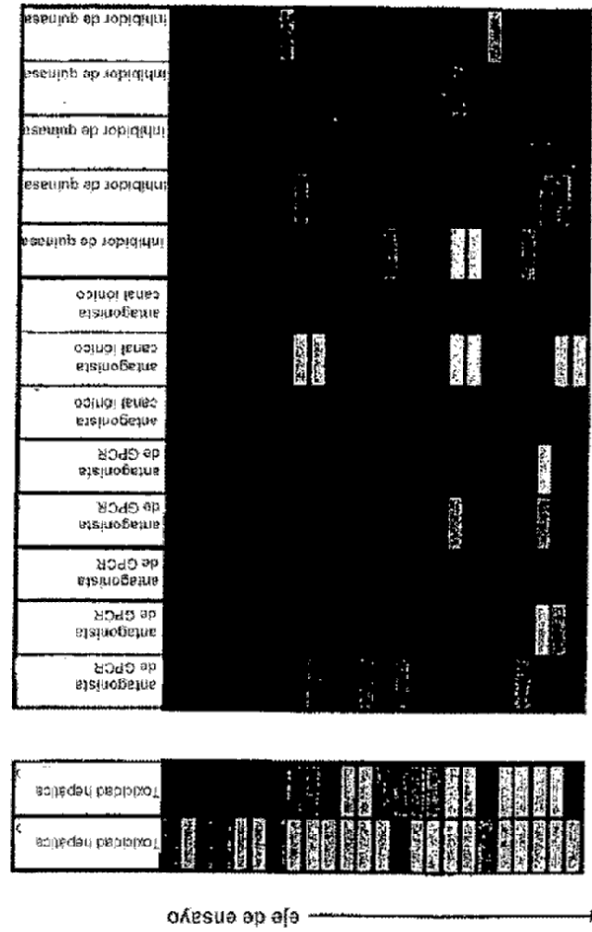




Figura 18. La toxicidad asociada con una falta general de selectividad celular puede identificarse en células humanas



Resultados de compuestos candidatos evaluados con paneles de ensayo en células HEK293. Los compuestos que muestran toxicidad hepática tuvieron amplios efectos fuera de ruta