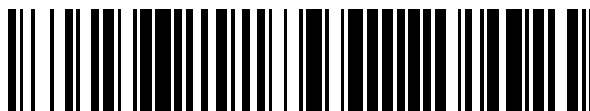


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 957**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/48 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008** **E 08804842 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013** **EP 2203564**

54 Título: **Cuantificación proteómica de la unión de pequeñas moléculas a proteínas celulares diana**

30 Prioridad:

05.10.2007 EP 07117996

05.10.2007 US 977692 P

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

27.01.2014

73 Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.
(100.0%)
HOFGARTENSTRASSE 8
80539 MÜNCHEN, DE**

72 Inventor/es:

**DAUB, HENRIK;
BAIRLEIN, MICHAELA;
SHARMA, KIRTI;
GODL, KLAUS;
TEBBE, ANDREAS y
WEBER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 439 957 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

Cuantificación proteómica de la unión de pequeñas moléculas a proteínas celulares diana

5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con métodos para la evaluación y/o cuantificación de la afinidad de unión de moléculas pequeñas u otros compuestos a componentes diana contenidos dentro de un analito, tales como proteínas diana contenidas dentro del proteoma de una célula o tejido.

10

Antecedentes de la invención

15 La industria farmacéutica en la actualidad se enfrenta a dos retos fundamentales en su procedimiento de desarrollo de fármacos, concretamente la identificación de proteínas diana apropiadas para intervención en enfermedad y la identificación de candidatos a fármaco de alta calidad que actúan específicamente en estas dianas. Estos dos retos son de máxima importancia en el diseño de medicinas exitosas.

20 La intervención con compuestos de bajo peso molecular representa un concepto terapéutico fundamental para el tratamiento de trastornos humanos. Debido a sus papeles clave en los procesos de transducción de señal implicados en la aparición y progreso de enfermedades severas tales como cánceres humanos, diversos miembros de la superfamilia de enzimas proteína quinasa se han fijado considerablemente como objetivos por moléculas pequeñas que interrumpen sus funciones catalíticas. Estos esfuerzos en el desarrollo de fármacos han proporcionado una plétora de herramientas para la
25 disección de la señalización celular mediante enfoques genéticos químicos. A diferencia de la inactivación genética clásica, la inhibición de moléculas pequeñas puede modular selectivamente la actividad catalítica de una proteína quinasa de un modo que es rápido, ajustable y, en la mayoría de los casos, reversible. Además, muchas interacciones proteína-proteína formadas mediante proteínas quinasas se preservan en presencia de antagonistas de moléculas pequeñas y pueden por lo tanto
30 diseccionarse a partir de sus funciones catalíticas.

A pesar de estas obvias ventajas, los antagonistas de moléculas pequeñas desarrollados para la inhibición de quinasas tienen el potencial de inactivar varias dianas en células intactas, debido a
35 elementos estructurales comunes que se encuentran en los dominios catalíticos de diferentes proteínas quinasas o incluso miembros de otras familias enzimáticas. La selectividad de los inhibidores de quinasa puede evaluarse mediante actividad paralela *in vitro* o ensayos de unión para grandes cantidades de proteínas quinasas recombinantes (Fabian, M.A. *et al.*, Nat. Biotechnol. 23, 329-36 (2005); Davies, S.P. *et al.*, Biochem. J. 351, 95-105 (2000)). Este enfoque proporciona sin
40 duda datos cuantitativos y valiosos acerca de la selectividad de los fármacos, pero tiene dos limitaciones principales: Primero, además de una parte significativa del complemento de proteína quinasa (= el quinoma), las dianas potenciales de otras clases enzimáticas están poco representadas o completamente ausentes de estos formatos de cribado. En segundo lugar, y quizás de forma más
45 importante, la colección de quinasas recombinantes incluidas en un panel de selectividad no se ajusta al perfil celular de dianas potenciales expresadas en, por ejemplo, un sistema celular en el que se investigan los efectos biológicos de un inhibidor de quinasa.

Estos defectos pueden abordarse con enfoques proteómicos, que emplean compuestos inmovilizados, por ejemplo, inhibidores de quinasa, para la purificación selectiva por afinidad de proteínas diana en
50 combinación con la identificación de proteínas, por ejemplo, mediante espectrometría de masas (MS). Esta sencilla técnica se ha usado con éxito para identificar los componentes diana de diversos inhibidores de quinasa en extractos celulares. Sin embargo, la identificación de componentes diana estaba limitada en el sentido de que las afinidades del inhibidor hacia sus parejas de unión celular no pudieron inferirse a partir de los datos de MS. Para obtener información cuantitativa adicional, fue
55 necesario recurrir a ensayos de actividad *in vitro* secundarios para identificar las dianas de inhibidor que eran inhibidas potentemente y por lo tanto eran potencialmente relevantes para las acciones celulares observadas del fármaco. Sin embargo, en la práctica, es un desafío evaluar el espectro completo de dianas de una molécula pequeña de fármaco debido al hecho de que las proteínas recombinantes requeridas no están todas disponibles o los ensayos *in vitro* demuestran ser difíciles de
60 establecer.

El documento US 5324633 describe un método para medir la afinidad de unión de un receptor a un ligando, de manera que un conjunto de polímeros, que se sintetizan o inmovilizan en un sustrato, se

exponen a un receptor marcado con fluorescencia en soluciones de diversa concentración y la intensidad de fluorescencia del receptor marcado se mide por medio de, por ejemplo, un contador de fotones que usa microscopía confocal. Un método para identificar dianas de SB 203580 mediante la inmovilización de un análogo de SB 203580 adecuado y cromatografía de afinidad se describe en Godl *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23; 100(26):15434-9, que permitió el enriquecimiento e identificación de dianas de proteína quinasa de SB 203580. Una técnica general libre de radiomarcaje sin modificación o inmovilización de los compuestos o de la proteína diana para clasificar las afinidades de unión proteína-ligando y determinar la competición alostérica contra la de sitio de unión directa en mezclas de compuestos se describe en Annis DA *et al.*, J Am Chem Soc. 2004 Dec 1; 126(47):15495-503. El documento US 2007087348 (A1) describe un método para determinar uno o más parámetros cinéticos de unión entre un primer miembro de unión y un segundo miembro de unión mediante la adsorción del primer miembro de unión a una superficie en una pluralidad de micropuntos. El segundo miembro de unión se presenta después al primer miembro de unión en cada uno de los micropuntos, existiendo una pluralidad de combinaciones de densidad de superficie del primer miembro de unión y concentración del segundo miembro de unión entre la pluralidad de micropuntos. Se obtienen después datos indicativos de una reacción de unión entre el primero de los micropuntos y se analizan para obtener uno o más parámetros cinéticos de la unión entre el primer y segundo miembros de unión. Valsasina B *et al.*, da una visión de conjunto de algunos ejemplos de perfilación de selectividad de quinasas mediante cromatografía por afinidad con el inhibidor (Expert Rev Proteomics. 2004 Oct; 1(3):303-15). Un método de espectrometría de masas por selección de afinidad (AS-MS) para medidas cuantitativas de afinidad de unión proteína-ligando (K_d) en grandes bibliotecas de compuestos, mediante el que la capacidad de un ligando de valoración para desplazar un miembro de la biblioteca unido a diana, como se midió mediante MS, revela la clasificación de afinidad del componente de la mezcla con relación a compuestos "calibrantes por afinidad interna" de afinidad conocida para la diana CDK2 se describe en Annis DA *et al.*, Anal Chem. 2007 Jun 15; 79(12):4538-42.

Lowe y colaboradores determinan la constante de disociación (K_L) de lactato deshidrogenasa (componente diana del analito) para 5'-AMP inmovilizado (ligando inmovilizado) en presencia de un NADH competidor en condiciones de lote. Basándose en volúmenes de elución K_L puede calcularse, siempre que K_i sea conocido (C. R. Lowe, *et al.*, Eur. J. Biochem., 1974, Vol. 42, páginas 1-6).

El conocimiento exhaustivo de las proteínas celulares marcadas como objetivo por la intervención de moléculas pequeñas es un prerrequisito para definir interacciones químico biológicas a nivel molecular (Daub, H. *et al.*, Assay Drug Dev. Technol. 2, 215-24 (2004); Fabian, M. A. *et al.*, Nat. Biotechnol. 23, 329-36 (2005)). Aunque las técnicas de purificación por afinidad junto con la espectrometría de masas (MS) se han usado exitosamente para identificar las proteínas interactuantes de inhibidores de moléculas pequeñas inmovilizadas, estos enfoques previos proteómicos no suministrando información de afinidades de dianas celulares (Godl, K. *et al.*, PNAS U.S.A., 100, 15434-9 (2003); Brehmer, D. *et al.*, Cancer Res. 65, 379-82 (2005); Daub, H., Biochim. Biophys. Acta 1754, 183-90 (2005)).

Existe por lo tanto la necesidad de métodos de proteómica que permitan la evaluación o determinación directa cualitativa y/o cuantitativa de interacciones de compuesto-componente diana, por ejemplo, interacciones inhibidor-proteína diana. También existe la necesidad de métodos del tipo mencionado anteriormente que pueden adaptarse para aplicaciones de alto rendimiento.

Descripción Resumida de la Invención

La presente invención se define en su sentido más amplio por las reivindicaciones anexas.

Los objetos anteriores se resuelven mediante los métodos de acuerdo con la presente invención. En virtud de estos métodos, es posible ahora determinar inmediatamente las afinidades de unión de un compuesto diana, tal como un inhibidor, hacia sus parejas de unión celular, bien cualitativa o bien cuantitativamente, sin tener que recurrir a unión secundaria *in vitro* o ensayos de actividad. Los métodos de la invención permiten adicionalmente la clasificación de un gran número de líneas celulares de un compuesto inmovilizado de acuerdo con sus afinidades y además evaluar sus propiedades de unión competitiva con relación a un inhibidor distinto sin inmovilización adicional. Esto se demuestra ejemplarmente en la presente memoria en más de 100 dianas celulares de inhibidores de quinasa. Los nuevos métodos son ampliamente aplicables y permiten la caracterización sencilla y rápida de interacciones farmacológicas y farmacocinéticas y/o funciones de cualquier tipo de moléculas pequeñas u otros compuestos de interés en diversos sistemas biológicos.

Así pues, en un aspecto, la invención proporciona un método para evaluar la afinidad de unión de un componente diana de un analito a un compuesto que comprende (a) poner en contacto una primera alícuota del analito con un soporte sólido en el que se inmoviliza el compuesto; (b) poner en contacto una segunda alícuota del analito con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a), separar posteriormente la segunda alícuota del analito de dicho soporte sólido; (c) volver a poner en contacto el analito separado del paso (b) con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a); (d) determinar las cantidades del componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (c); y (e) comparar la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en la etapa (a) con la cantidad de componente diana unido al soporte sólido de la etapa (c), en donde la comparación de la etapa (e) se utiliza para determinar el valor de K_d de la unión de dicho compuesto inmovilizado a dicho componente diana. Los métodos de acuerdo con este aspecto también se denominan en la presente memoria como métodos de acuerdo con IVA2 (*In Vitro Association*: Composición 2).

Aunque no es estrictamente obligatorio, el método anterior puede comprender adicionalmente la etapa de poner en contacto una tercera alícuota de dicho analito con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a), que no tiene, sin embargo, dicho compuesto inmovilizado en él y determinar la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido. Esta etapa puede servir como control negativo mediante el que puede determinarse la unión posiblemente inespecífica de los componentes diana del analito al soporte sólido a diferencia de la unión específica del mismo al compuesto inmovilizado de interés.

En consecuencia, la etapa (e) del método anterior puede comprender adicionalmente comparar las cantidades del componente diana unido al soporte sólido a las etapas (a) y (c) con la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido que no tiene dicho compuesto inmovilizado en él. Como alternativa, la etapa (e) puede comprender comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (c) con una cantidad de componente diana unido inespecíficamente al material de soporte habiéndose determinado previamente o teniendo aún que determinarse dicha cantidad en un experimento o experimentos independientes o se determina por otros medios, tales como cálculo o extrapolación de datos preexistentes, por ejemplo, datos disponibles de la bibliografía o datos aún por obtener.

En una realización preferida, se realizan simultáneamente las etapas de contacto (a) y (b) y preferiblemente también la etapa de contacto relativa a la tercera alícuota del método anterior. Como alternativa, pueden realizarse simultáneamente la etapa de contacto (a) y la etapa de recontacto (c) y preferiblemente también la etapa de contacto relativa a la tercera alícuota del método anterior pueden realizarse simultáneamente.

En un aspecto adicional relacionado la invención proporciona un método para evaluar la afinidad de unión de un componente diana de un analito a un compuesto que comprende (a) poner en contacto una primera alícuota del analito con un soporte sólido en el que se inmoviliza el compuesto; (b) poner en contacto una segunda alícuota del analito con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a) en el que dicho compuesto se inmoviliza, sin embargo, a una mayor concentración que en (a); (c) poner en contacto una tercera alícuota del analito con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a) en el que dicho compuesto se inmoviliza, sin embargo, a una concentración mayor que la etapa (b); (d) determinar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido de las etapas (a), (b) y (c); y (e) comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a), (b) y (c), en donde la comparación de la etapa (e) se utiliza para determinar el valor de K_d de la unión de dicho compuesto inmovilizado a dicho componente diana. Los métodos de acuerdo con este aspecto también se denominan en la presente memoria métodos de acuerdo con IVA1 (*In Vitro Association*: Composición 1).

Se pondrá de manifiesto que la etapa (c) del método anterior no es estrictamente obligatoria, puesto que el método proporciona información útil cualitativa y también cuantitativa sobre la afinidad de unión incluso en ausencia de la etapa opcional (c). En una realización preferida de la invención, los métodos de acuerdo con IVA1 contienen, sin embargo, una etapa (c) como se ha definido anteriormente.

También con respecto a este aspecto de la invención, puede ser útil incluir adicionalmente un control negativo, aunque esto de nuevo no es estrictamente obligatorio. Así pues, el método puede comprender la etapa de poner en contacto una cuarta alícuota de dicho analito con un soporte sólido del tipo de la etapa (a) que, sin embargo, no tiene dicho compuesto inmovilizado en él y determinar la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido. Esto permite determinar la unión

posiblemente inespecífica del componente diana al soporte sólido a diferencia de la unión específica del componente diana al compuesto de interés inmovilizado en dicho soporte.

5 En consecuencia, la etapa (e) del método de acuerdo con IVA1 puede comprender adicionalmente
 10 comparar las cantidades de compuesto diana unido al soporte sólido en las etapas (a), (b) y (c) con la
 cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido que no tiene dicho componente
 inmovilizado en él. Como alternativa, la etapa (e) puede comprender comparar las cantidades de
 componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a), (b) y (c) con una cantidad de componente
 15 diana unido inespecíficamente al material de soporte, en el cual esta cantidad se ha determinado
 previamente o debe aún determinarse en un experimento o experimentos independiente(s) o se
 determina mediante otros medios, tales como cálculo o extrapolación de datos preexistentes, por
 ejemplo, datos disponibles de la bibliografía o de datos aún por obtener.

15 En una realización preferida de este aspecto, las etapas de contacto (a), (b) y (c) y preferiblemente
 también la etapa de contacto relacionada con la cuarta alícuota del método anterior se realizan
 simultáneamente. Como alternativa, las etapas de contacto (a), (b) y (c) y preferiblemente también la
 etapa de contacto relativa a la cuarta alícuota del método anterior pueden realizarse
 consecutivamente.

20 Se pondrá de manifiesto que los métodos de la presente invención de acuerdo con IVA1 o IVA2
 descritos y/o reivindicados en la presente memoria pueden combinarse. Específicamente, la unión de
 un componente diana de un analito a un compuesto inmovilizado puede primero determinarse o
 evaluarse mediante un método de acuerdo con IVA1 y, posteriormente, puede evaluarse
 25 adicionalmente por un método de acuerdo con IVA2.

25 En un aspecto relacionado adicional más, la invención proporciona un método para evaluar la afinidad
 de unión de un componente diana de un analito a un compuesto competidor que comprende (a) poner
 en contacto una primer alícuota del analito con un soporte sólido en el que se inmoviliza un compuesto
 que se une al componente diana con una afinidad de unión dada, en el cual el contacto se realiza en
 30 presencia de dicho compuesto competidor; (b) poner en contacto una segunda alícuota del analito con
 un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a) en presencia de dicho compuesto competidor, en el
 cual la concentración de dicho compuesto competidor es más alta que en la etapa (a); (c) poner en
 contacto una tercera alícuota del analito con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a) en
 presencia de dicho compuesto competidor, en el cual la concentración de dicho compuesto competidor
 35 es más alta que en la etapa (b); (d) determinar las cantidades de componente diana unido al soporte
 sólido de las etapas (a), (b) y (c); y (e) comparar las cantidades de componente diana unido al soporte
 sólido en las etapas (a), (b) y (c); en donde la comparación de la etapa (e) se usa para determinar el
 valor de K_d de la unión de dicho compuesto competidor a dicho componente diana. Los métodos de
 acuerdo con este aspecto también se denominan en la presente memoria como métodos de
 40 competidor IVA (*In Vitro Association*).

Se pondrá de manifiesto que la etapa (c) del método anterior no es estrictamente obligatoria, puesto
 que el método proporciona información útil cualitativa y también cuantitativa sobre la afinidad de unión
 incluso en ausencia de la etapa opcional (c). En una realización preferida de la invención, los métodos
 45 de competidor IVA contienen, sin embargo, una etapa (c) como se ha definido anteriormente.

También se pondrá de manifiesto que de acuerdo con este aspecto de la invención, la afinidad de
 unión dada con la que el compuesto inmovilizado se une al componente diana puede ser una afinidad
 de unión predeterminada. En una realización preferida, la afinidad de unión, por ejemplo, un valor K_d ,
 50 se determina o se ha determinado, mediante cualquiera de los métodos de la presente invención de
 acuerdo con IVA1 y/o IVA2.

Como alternativa, la afinidad de unión dada con la que el compuesto inmovilizado se une al
 componente diana también puede ser una afinidad de unión que se ha determinado previamente o va
 55 a determinarse en un experimento o unos experimentos independientes o que se determina por otros
 medios, tales como cálculo o extrapolación de datos preexistentes, por ejemplo, datos disponibles en
 la bibliografía o de datos aún por obtener.

Un método de competidor IVA de la invención puede comprender adicionalmente la etapa de poner en
 60 contacto una cuarta alícuota de dicho analito con un soporte sólido del tipo usado en la etapa (a) en el
 que dicho compuesto con dicha afinidad de unión dada se inmoviliza, en el cual el contacto se realiza,
 sin embargo, en ausencia de dicho compuesto competidor. En este caso, la etapa (e) del método

preferiblemente comprende adicionalmente comparar las cantidades del componente diana unido al soporte sólido de las etapas (a), (b) y (c) con la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido en ausencia de dicho compuesto competidor.

- 5 De acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención descritos en la presente memoria, los componentes diana en el analito preferiblemente se marcan con una marca detectable. Mientras que el marcador detectable puede ser el mismo en cada alícuota, el marcador detectable es preferiblemente diferente en cada alícuota, es decir, los componentes diana de la primera alícuota tienen un marcador que es diferente de los componentes diana de la segunda alícuota y así sucesivamente. Esto puede lograrse fácilmente mediante marcaje directo de las alícuotas con diferentes marcadores detectables, o en el caso de los analitos, que se derivan de tejido, cultivo tisular, células, cultivo celular o fluidos corporales, mediante marcaje metabólico *in vivo* o en cultivo usando diferentes marcadores detectables.
- 10
- 15 En caso de que se usen diferentes marcadores detectables para marcar los componentes diana de las diferentes alícuotas usadas en los métodos de la invención, la determinación de la etapa (d) de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención se realiza ventajosamente mediante la combinación de dichos componentes diana unidos en una muestra y la detección de las cantidades de los componentes diana marcados de forma diferente en dicha muestra. A este respecto, puede ser ventajoso eluir los componentes diana del soporte sólido antes de combinarlos en dicha muestra.
- 20
- Se pondrá de manifiesto que la comparación de acuerdo con la etapa (e) de cualquiera de los métodos de la invención puede usarse para determinar o calcular cualitativa y/o cuantitativamente la afinidad de unión del componente diana al compuesto.
- 25
- Se pondrá de manifiesto también que en virtud de los métodos de acuerdo con la invención la afinidad de unión de una multitud de componentes diana hallados dentro de un analito por el compuesto inmovilizado y/o el compuesto competidor puede simultáneamente evaluarse y determinarse.
- 30
- Se pondrá de manifiesto adicionalmente que los métodos de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para aplicarse a enfoques de cribado de alto rendimiento. Así pues, en otra realización de la invención los métodos descritos y/o reivindicados en la presente memoria se realizan al completo o al menos en parte en un modo de alto rendimiento.

35 Breve Descripción de los Dibujos

Fig. 1: Representación esquemática de métodos preferidos de acuerdo con la invención.

- 40 (a) IVA1 (*In Vitro Association*: Composición 1) – Cuantificación de unión dependiente de dosis de proteínas celulares diana a un inhibidor inmovilizado de molécula pequeña
- (b) IVA2 (*In Vitro Association*: Composición 2) – Ciertos defectos de IVA1 resueltos por dos ciclos paralelos de purificación por afinidad consecutivos a la mayor densidad de ligando y una incubación adicional con perlas control desprovistas de inhibidor inmovilizado.
- 45 (c) Experimento control para verificar que el ligando inmovilizado está presente en exceso molar sobre sus proteínas diana en el extracto biológico analizado.

Fig. 2: Dianas celulares específicas del inhibidor V16742 identificadas por el enfoque químico cuantitativo MS.

- 50 (a) Estructura química del compuesto V16742, que se acopló a través del grupo amino primario a sefarosa epoxi-activada.
- (b) Las dianas celulares de V16742 identificadas por MS cuantitativa se disponen de alta a baja afinidad de las dianas en una escala de valor de Kd. Se muestran las exploraciones de FT-MS LTQ-Orbitrap representativas correspondientes a las composiciones IVA1 e IVA2 para una diana de cada clase (afinidad alta, moderada y baja). Los máximos monoisotópicos usados para la cuantificación se marcan con flechas de diferentes sombreados de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 1.
- 55 (c) Confirmación de los resultados de análisis por espectrometría de masas. Asociación *in vitro* de lisados totales de células HeLa con matriz de control o matriz V16742 según composiciones IVA1 (unión dependiente de dosis) o IVA2 (enriquecimiento en segundo ciclo de IVA) representado en la Figura 1. Las proteínas unidas eluidas de la matriz se inmunotransfirieron
- 60

con anticuerpos específicos para JNK2 (diana de alta afinidad), RIPK2 (diana de afinidad moderada), ERK2 (diana de afinidad baja) y ROCK2 (diana de afinidad muy baja no enriquecida significativamente en IVA2).

- (d) Perfil de especificidad del inhibidor V16742. El dendograma de quinasa se adapta de Cell Signalling Technology, Inc. TK, tirosina quinasa no receptoras; RTK, tirosina quinasa receptoras; TKL, quinasa de tipo tirosina quinasa; CK, familia de caseína quinasa; PKA, familia de proteína quinasa A; CAMK, quinasa dependientes de calcio/calmodulina; CDK, quinasa dependientes de ciclina; MAPK, proteína quinasa activadas por mitógeno; CLK, quinasa de tipo CDK. Las dianas de quinasa de V16742 con afinidades de unión alta, moderada o baja son representadas por círculos de diferentes tamaños como se indica en la Figura.

Fig. 3: Determinación de IC_{50} para un inhibidor de interés (SB203580) con respecto a la competición por su unión a un inhibidor inmovilizado (V16742).

- (a) Representación esquemática del enfoque de unión competitiva para el análisis de selectividad: diseño experimental para MS cuantitativa de prevención dependiente de dosis de la unión de la diana SB203580 al inhibidor de molécula pequeña V16742.
- (b) Espectros de MS de un péptido representativo derivado de la proteína diana más alta SB203580, RIPK2, muestran que es retenido con afinidad moderada por la resina V16742.
- (c) Análisis por inmunotransferencia del perfil de selectividad competidora. Las reacciones IVA de lisados de células HeLa con perlas V16742 inmovilizadas se realizaron en presencia de concentraciones crecientes de SB203580. Las proteínas unidas eluidas de la matriz se inmunotransfirieron con anticuerpos indicados contra las dianas SB203580 para confirmar los resultados de espectrometría de masas.

Fig. 4: Evaluación de las constantes de disociación específicas para diana por proteómica química cuantitativa.

- (a) Células HeLa se codificaron por SILAC con arginina y lisina normal o marcadas con isótopos estables. Se prepararon lisados celulares y se incubaron con resina de control (C) o se sometieron a tanto una como dos asociaciones in vitro con perlas que contienen AX14596 (AX). Las tres fracciones de elución se reunieron y se analizaron por EM-CL cuantitativa para identificar ligantes específicos y para determinar fracciones de diana sin unir (=r) y unidas (1-r). Las relaciones de las mismas multiplicada por la concentración de AX14596 es igual a las constantes de disociación específicas para diana (=Ki) para AX14596 inmovilizado, ya que se alcanzaron equilibrios de unión en presencia de un exceso molar de moléculas de captura y los complejos Mg^{2+} -ATP se rompieron debido a la presencia de agentes quelantes.
- (b) Se incubaron lisados de células codificadas por SILAC con perlas AX14596 en presencia de diferentes concentraciones de gefitinib. Las fracciones de proteína unida se combinaron como se indica y se evaluaron cuantitativamente en experimentos de EM-CL en paralelo. Se determinaron los valores de CI_{50} para el desplazamiento de proteína dependiente de gefitinib de la resina AX14596 y luego se usaron para calcular constantes de disociación específicas para diana para gefitinib.

Fig. 5: Panel de quinasa celulares para el perfilado de inhibidores cuantitativos.

- (a) Las afinidades de unión de los componentes diana celulares para el inhibidor de quinasa no selectivo inmovilizado V16742 se determinaron según la estrategia brevemente resumida en la Fig. 4. Las proteínas quinasa que interaccionan con V16742 de células HeLa se marcan en el dendograma del kinoma humano. El tamaño de los círculos rojos indica las afinidades de unión respectivas. Los espectros de EM de péptidos representativos y los valores de Ki determinados se muestran para varios componentes diana de la quinasa V16742. El dendograma de quinasa se adaptó con permiso de Cell Signaling Technology (www.cellsignal.com).
- (b) Inhibición dependiente de la concentración de la unión de proteína quinasa a la resina V16742 por SB203580. Los valores de CI_{50} determinados en los experimentos de competición y los valores de Ki resultantes se muestran para dianas celulares de SB203580.

Fig. 6: Correlación de los datos de unión a diana cuantitativos para análisis por duplicado.

(a) Perfil experimental. Células HeLa S3 se codificaron con SILAC con arginina y lisina normal (Arg0/Lys0) o variantes sustituidas con isótopos estables (Arg6/Lys4, Arg10/Lys8) antes de la lisis de células. En el esquema de marcado normal, los extractos de proteína codificados por Arg0/Lys0 se sometieron a una etapa de incubación con las perlas de inhibidor (I), mientras que el lisado marcado con Arg10/LysB se sometió a dos asociaciones in vitro consecutivas. Los lisados codificados por Arg0/Lys0 y Arg10/Lys8 se cambiaron en un experimento cruzado con un esquema de marcado inverso. El experimento cruzado verificó la reproducibilidad de la unión de la diana específica y proporcionó un medio eficaz para eliminar la identificación de diana positiva falsa. Lo último puede ser debido a la presencia de pequeñas cantidades de especies de proteínas contaminantes que no son de origen celular y, por tanto, solo se identifican mediante especies de péptidos marcadas con Arg0 y/o Lys0. Esto es importante, ya que dianas específicas de muy alta afinidad producirían un patrón de SILAC similar en el esquema de marcado "normal". Para explicar la unión de referencia no específica, lisados celulares marcados con Arg6/Lys4 se incubaron con resina de control (C). Después de las etapas de asociación in vitro, las proteínas unidas a resina se eluyeron y se analizaron por EM-CL cuantitativa.

(b) Ilustración que representa cómo en el esquema de marcado normal las intensidades de los iones de péptido especifican el porcentaje de proteína diana retenida por purificación por afinidad con una resina inhibidora de quinasas. Considerando, por ejemplo, una diana de alta afinidad de la que el 90% es retenido por el inhibidor inmovilizado y el 10% queda sin unir en la fracción de sobrenadante, entonces el 9% (90% del 10%) de la población diana inicial se une a la resina de afinidad cuando el sobrenadante se somete a la misma cantidad de inhibidor inmovilizado en una segunda etapa de asociación in vitro. La relación de diana resultante $r = 0,1$, como se ha determinado por cuantificación habilitada por SILAC de las abundancias relativas de péptidos derivados de diana, indica que la fracción de la diana no es retenida por la resina de afinidad. Por consiguiente, $1-r = 0,9$ representa una medida de la fracción de diana que se une a las perlas de inhibidor.

(c, d) Relaciones de cantidades de proteína diana retenidas en la segunda frente a la primera ronda de unión a perlas AX14596 (a) o VI16742 (b) se comparan para los experimentos con SILAC hechos según el esquema de marcado inverso (eje x) y normal (eje y). Las líneas de puntos indican correlación máxima entre los experimentos duplicados.

Fig. 7: Análisis de unión de proteína diana con el tiempo.

(a) Para verificar que las reacciones de unión a diana han alcanzado el equilibrio dentro de las 2,5 horas de incubación usadas durante todo este estudio, lisados diferencialmente codificados por SILAC se sometieron a tanto 5 horas como a 2,5 horas de asociación in vitro en presencia de perlas que contenían inhibidor inmovilizado. Las fracciones de elución se combinaron y se analizaron por EM-CL cuantitativa.

(b, c) Las relaciones de diana unida a resina después de 5 h frente a 2,5 h se determinaron y se representaron contra los valores transformados por $\log_{10}$ de las constantes de disociación de la diana para tanto AX14596 (b) como VI16742 (c) inmovilizados. La mayoría de los valores representados fueron próximos a una línea vertical que corta el eje x a una relación de 1, que indica condiciones próximas a la unión en equilibrio para las resinas AX14596 (b) o VI16742 (c).

Fig. 8: Experimentos de control para determinar si la concentración de inhibidor inmovilizado está presente o no en exceso molar con respecto a sus proteínas diana celulares.

(a) Se realizaron experimentos con SILAC en los que tanto 3 mg como 1 mg de proteína celular se sometieron a resina de afinidad por inhibidor en el mismo volumen de incubación. Los eluatos de las dos reacciones de incubación paralelas se reunieron y se analizaron por EM-CL cuantitativa.

(b, c) Se determinaron las relaciones de proteínas diana asociadas a resina unidas a 3 mg en comparación con 1 mg de extractos celulares y se representaron contra los valores transformados por $\log_{10}$ de las constantes de disociación de diana para tanto AX14596 (b) como VI16742 (c) inmovilizados. Las relaciones de proteína próximas a tres indicaron que la

concentración eficaz de los inhibidores de quinasas inmovilizados no era un factor limitante en el ensayo de unión.

Fig. 9: Correlación de datos de unión a diana en análisis por duplicado de experimentos de competición.

(a) Se hicieron ensayos de competición que incluyen perlas de inhibidor y diferentes concentraciones de inhibidores de quinasas "libres" en análisis por duplicado, en los que el inhibidor libre se añadió tanto 30 min antes (experimento 1) a como 30 min después de la adición (experimento 2) de las perlas de afinidad por inhibidor. La segunda etapa de incubación se realizó durante 2,5 h antes de la elución de la proteína diana y EM-CL cuantitativa.

(b, c) Los valores de CI50 para los componentes diana inhibidores se determinaron por separado basándose en los datos de competición de los experimentos 1 y 2. La relación de estos valores de CI50 se transformó por log2 y se representó frente a las relaciones transformadas por el log10 de las afinidades por diana calculadas (valores de Ki) para tanto gefitinib (b, probado contra la resina AX14596) como SB203580 (c, probado contra la resina V116742). Distribuciones del componente diana similares entre la fase estacionaria y soluble en los experimentos 1 y 2 fueron evidentes a partir de las relaciones de CI50 transformadas por log2 que eran próximas a cero. Por tanto, además de demostrar la reproducibilidad de los ensayos de competición, se verificó la reversibilidad de la interacción componente diana - compuesto (inhibidor) que indica que se han alcanzado los equilibrios de unión en los ensayos de competición.

Fig. 10: Estructura química de V116742 y análisis de ontología génica (GO) de proteínas unidas a resina.

(a) Está rodeado con un círculo el grupo funcional para la inmovilización covalente de V116742.

(b) Los términos de función molecular de GO significativamente sobrerrepresentados ($P < 0,001$) para todas las proteínas cuantificadas retenidas por perlas de afinidad por V116742 y el subconjunto de proteínas caracterizado como componentes diana de inhibidor específicos. La sobrerrepresentación de términos de GO tales como actividad de proteínas quinasa y quinasas de lípidos fue mucho más pronunciada en la fracción diana específica en comparación con todas las proteínas unidas a resina inhibidora.

Fig. 11: Comparación de datos de proteómica química con resultados de ensayos quinasa in vitro.

Los valores de Ki determinados para gefitinib celular y dianas de SB203580 por proteómica química (Ki, cp) se transformaron por log10 y se representaron contra los valores transformados por log10 de CI50 para gefitinib (puntos gris oscuro) y SB203580 (puntos gris claro) a partir de ensayos de inhibición in vitro con proteínas quinasas recombinantes (Ki, ka) (Tabla 6). Debido al uso de concentraciones de ATP submicromolares, los valores de CI50 de los ensayos enzimáticos representaron una estrecha aproximación de los valores de Ki reales. Estos resultados indican una mejor correlación de análisis proteómico químico y ensayos de actividad enzimática en comparación con los datos informados para un enfoque de proteómica química previamente publicado (datos no mostrados) (Bantscheff, M. y col. Quantitative chemical proteomics reveals mechanism of action of clinical ABL kinase inhibitors. Nat Biotechnol 25, 1035-1044 (2007)).

Figura 12: Estructura de dasatinib y la resina de afinidad por dasatinib inmovilizada correspondiente.

Figura 13: Afinidades por diana para dasatinib libre en disolución.

Las afinidades por diana se determinaron para dasatinib libre en disolución. Se cultivaron células K562 en presencia de formas normales y dos diferentes formas de aminoácidos marcados con isótopos estables (SILAC). Los lisados celulares diferencialmente marcados se incubaron (lado izquierdo) con perlas de afinidad por dasatinib que tenían diferentes concentraciones de dasatinib covalentemente inmovilizado y (lado derecho) con perlas de afinidad por dasatinib que tenían la mayor densidad de ligandos en presencia de concentraciones crecientes de dasatinib libre. Las proteínas unidas a dasatinib inmovilizado se eluyeron y se analizaron por EM/EM-CL cuantitativa. Las relaciones de proteína determinadas

para las diversas muestras permitieron el cálculo de valores de Kd para dasatinib libre (Kd, dasatinib libre) usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

5 BC50 indica la concentración de dasatinib inmovilizado que permite el 50% de unión de la proteína diana. CC50 indica la concentración de dasatinib libre que inhibe el 50% de unión de la proteína diana a dasatinib inmovilizado. El término Cdasatinib inmovilizado representa la concentración de dasatinib inmovilizado usado en los experimentos de competición para la determinación de CC50.

10 *Figura 14: Tabla de proteínas diana de dasatinib determinadas a partir de extractos de células K562 y sus valores de Kd correspondientes.*

Descripción Detallada de la Invención

15 El término “analito” como se usa en la presente memoria puede ser un proteoma, una mezcla de diferentes proteomas, un lisado o extracto celular, un lisado o extracto tisular, un sobrenadante de cultivo celular, un sobrenadante de cultivo tisular o un fluido corporal, tal como leche, líquidos o linfa.

20 El término “proteoma” como se usa en la presente memoria se refiere a la composición proteica específica de una célula, tejido u organismo. Dependiendo de las células individuales contenidas en el mismo, un cultivo de una célula o un tejido puede, teóricamente, contener tantos proteomas como células hay contenidas en el mismo. Por conveniencia, los proteomas de un cultivo celular o de un tejido se consideran como representativos de un proteoma. Los proteomas de un tipo de organismo pueden diferir de otro dependiendo del estado y fondo genómico de sus células.

25 Para los propósitos de la presente invención, pueden usarse una diversidad de proteomas como analitos. Dichos proteomas pueden derivarse de células individuales o cultivos celulares realizados a partir de una población homogénea de células o de una mezcla de células. También pueden derivarse de un tejido, órgano u organismo. Además, dicha célula individual, cultivo celular o mezcla de células, 30 tejido, órgano u organismo puede exponerse a ciertas condiciones, tales como calor, estrés, privación de alimento, fármacos, radiactividad, agentes químicos, toxinas, infección vírica, antibióticos y envejecimiento. Estas condiciones conducen a diferentes “conjuntos” de proteomas que también pueden usarse como analitos en los métodos de la invención y compararse entre sí en términos de la unión a los componentes diana contenidos en los mismos para un compuesto dado de 35 interés. Estos proteomas reflejan de este modo una situación que se asemeja a la situación *in vivo* tanto como sea posible.

Los proteomas a usar como analitos de acuerdo con la invención pueden derivarse de células procariotas o eucariotas, tales como células bacterianas, microorganismos patógenos, células 40 fúngicas, células de levadura, células vegetales, células de mamífero, células de peces, células de nematodo, células de insectos y, en particular, células madre tales como células madre embrionarias o adultas, por ejemplo, células madre embrionarias madre o adultas no humanas. Adicionalmente, los métodos de la invención pueden aplicarse a una amplia diversidad de proteomas que están presentes en o derivan de un tejido u órgano, tal como tejido conectivo, tejido endotelial, cerebro, hueso, hígado, 45 corazón, músculo esquelético, próstata, colon, riñón, glándulas, ganglios linfáticos, páncreas, raíces, hojas y flores. Finalmente, los proteomas adecuados pueden ser los presentes en un organismo no humano o derivados de un organismo, tales como *E. coli*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, pez cebra, rata, hámster, ratón, cabra, oveja, mono, ser humano y medusa o un organismo vegetal tal como arroz, patata, Arabidopsis, trigo, avena y tabaco.

50 Como se usa en la presente memoria, un “componente diana” puede ser cualquier componente dentro de un analito que es capaz de interactuar, por ejemplo, unirse, al compuesto de interés. Un componente diana puede ser, por lo tanto, por ejemplo, un oligo o polisacárido, un ácido nucleico, un proteoglicano, un péptido o una proteína, que incluye glicoproteínas. En una realización preferida, el 55 componente diana del analito de acuerdo con la invención es una proteína. Preferiblemente, la proteína es una quinasa y más preferiblemente una proteína quinasa. En una realización igualmente preferida, el componente diana es un lípido quinasa.

60 El compuesto inmovilizado en el soporte sólido o el compuesto competidor de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto de interés seleccionado de enzimas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos y fragmentos de los mismos, oligo o polisacáridos, proteoglicanos, entidades químicas,

moléculas pequeñas, fármacos, metabolitos o profármacos. Preferiblemente, el compuesto o compuesto competidor es un inhibidor del componente diana en el analito.

5 Son ejemplos preferidos de dichos compuestos o compuestos competidores los compuestos químicos, moléculas pequeñas, péptidos, proteínas, anticuerpos y similares sintéticos y/o de origen natural.

10 La expresión “molécula pequeña” como se usa en la presente memoria se refiere a moléculas que muestran un peso molecular de menos de 5000 Da, más preferiblemente menos de 2000 Da, incluso más preferiblemente menos de 1000 Da y más preferiblemente menos de 500 Da. Dichos compuestos pueden ser “candidatos” adecuados para optimización adicional.

15 Los compuestos o compuestos competidores que son compuestos de “moléculas pequeñas” sintéticas y/o de origen natural, por ejemplo fármacos, metabolitos, profármacos, fármacos potenciales, metabolitos potenciales, profármacos potenciales y similares, se prefieren para su uso en los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria. Preferiblemente, dichos compuestos o compuestos competidores se seleccionan del grupo que consiste en compuestos químicos sintéticos o de origen natural o fármacos orgánicos sintéticos, más preferiblemente moléculas pequeñas, fármacos orgánicos o compuestos de moléculas pequeñas naturales.

20 En una realización preferida de los métodos de la invención, el componente diana es una quinasa y el compuesto inmovilizado de interés y el compuesto competidor es un inhibidor de quinasa.

25 Sin embargo, la presente invención también comprende el uso de compuestos o compuestos competidores que son ácidos nucleicos, tales como ADN, ARN y/o ANP (ácido nucleico proteico). Dichos ácidos nucleicos pueden estar presentes en forma de oligonucleótidos o polinucleótidos, incluyendo ácidos nucleicos que comprenden secuencias y/o motivos de nucleótidos específicos. También pueden usarse híbridos entre las diferentes formas de ácidos nucleicos.

30 La expresión “soporte sólido” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier soporte no disuelto capaz de inmovilizar el espectro anterior de compuestos de interés en su superficie. Los materiales que pueden usarse como soportes sólidos son muchos e incluyen, pero no se limitan a, sílice fundida, cuarzo, silicio, plásticos, vidrio, oro, metales, electrodos transparentes (por ejemplo, óxido de indio estaño o materiales relacionados), cerámicas (por ejemplo, óxidos de metal), papel, carbono conductor, polímeros conductores, filtros, portaobjetos de vidrio, superficies de silicio, perlas y
35 una microserie química adaptada (en inglés “*customized chemical microarray*”). Dichos materiales adecuados pueden tomar la forma de perlas pequeñas, pellets, discos, microplacas, platos, placas multipocillo, obleas (en inglés “*wafers*”) o similares, aunque también pueden usarse otras formas.

40 En una realización preferida de cualquiera de los métodos de la presente invención, los compuestos se unen a perlas, tales como perlas de sefarosa (por ejemplo, sefarosa activada por NHS) o agarosa. En una realización particularmente preferida, dichas perlas son de sefarosa, opcionalmente epoxi activada o NHS activadas, o perlas de agarosa. Por ejemplo, un compuesto inhibidor (tal como V16742, Figura 2a) puede acoplarse a perlas de sefarosa epoxi activadas a tres concentraciones diferentes y la concentración relativa de inhibidor inmovilizado covalentemente en las diferentes
45 resinas se determina por espectrofotometría (aquí 1, 5 y 25 veces la concentración más baja).

El material de soporte sólido adecuado también puede comprender o consistir en partículas ferro o ferrimagnéticas como se conocen, por ejemplo, a partir del documento WO 01/71732. Las partículas ferro o ferrimagnéticas pueden comprender vidrio o plástico. Las partículas ferro o ferrimagnéticas que
50 pueden usarse en el contexto de la presente invención pueden ser porosas. Las partículas de vidrio ferro o ferrimagnéticas pueden comprender aproximadamente del 30 al 50% en peso de Fe_3O_4 y aproximadamente del 50 al 70% en peso de SiO_2 . Las partículas ferro o ferrimagnéticas útiles preferiblemente tienen un tamaño medio de aproximadamente 5 a 25 μm en diámetro, más preferiblemente aproximadamente de 6 a 15 μm y particularmente aproximadamente de 7 a 10 μm . El
55 área de superficie total de las partículas ferro o ferrimagnéticas puede ser de 190 g/m o mayor, por ejemplo, en el intervalo de aproximadamente 190 a 270 g/m (como se determinó de acuerdo con el método del Brunaur Emmet Teller (BET)).

60 Estas partículas magnéticas facilitan la purificación, separación y/o ensayo de biomoléculas, tales como proteína quinasas. Las partículas magnéticas (o perlas) que se unen a una molécula de interés pueden recogerse o recuperarse mediante la aplicación de un campo magnético externo a un depósito que comprende las partículas.

La inmovilización de los compuestos en el material de soporte sólido puede conseguirse mediante adsorción, absorción, enlace iónico, enlace covalente, un grupo amino o grupo carboxi o grupo hidroxilo, interacciones (estrept)avidina-biotina o tiol-oro y cualquier otro método que pueda unir los materiales a una densidad o concentración controlable.

El compuesto inmovilizado está presente preferiblemente en una concentración definida en el soporte sólido. Las concentraciones o los intervalos de concentración preferidos a este respecto son concentraciones de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 10 mM, preferiblemente de aproximadamente 100 nM a aproximadamente 10 nM o de aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 5 mM.

En una realización preferida de cualquiera de los métodos de la invención, el compuesto se acopla covalentemente al soporte sólido. Antes del acoplamiento, el material de soporte sólido o matriz puede contener grupos activos tales como NHS, carbodiimida, etc. para permitir la reacción de acoplamiento con compuestos. Los compuestos pueden acoplarse al soporte sólido mediante acoplamiento directo (por ejemplo usando grupos funcionales tales como grupos amino, sulfidrido, carboxilo, hidroxilo, aldehído y cetona) y por acoplamiento indirecto, por ejemplo, mediante biotina, estando la biotina unida covalentemente al compuesto y unión no covalente de biotina a estreptavidina que se une al soporte sólido directamente.

El par de afinidad biotina-avidina es la técnica de secuestro y separación por afinidad más explotada para aplicaciones biológicas. El sistema se basa en la inmovilización de avidina, estreptavidina o neutravidina en un soporte sólido. Una molécula cebo biotinilada se mezcla con un lisado celular. Esta mezcla se carga después en la columna de afinidad basada en avidina y se lava para eluir las proteínas de unión inespecífica. La proteína deseada puede después liberarse mediante lavado con varios reactivos disponibles. Una cantidad sustancial de trabajo indica que la neutravidina monomérica puede usarse para minimizar interacciones inespecíficas con proteínas comunes. Adicionalmente están fácilmente disponibles muchos reactivos químicos que permiten la biotinilización de moléculas pequeñas que tienen grupos funcionales específicos.

En una realización preferida de cualquiera de los métodos de la invención, el compuesto se inmoviliza en el material de soporte sólido, particularmente perlas, mediante un grupo amino, un grupo hidroxilo o un grupo carboxi.

Aunque no es obligatorio, puede ser útil inmovilizar el compuesto en el material de soporte sólido mediante un agente de unión o un espaciador. Para unir compuestos al soporte sólido pueden usarse varios sistemas de anclaje. Por ejemplo, pueden usarse agentes de unión covalentes entre compuesto y soporte sólido. Pueden usarse técnicas combinatorias para optimizar factores tales como el tipo de agente de unión, rigidez y longitud óptima para unión proteica, mientras que se minimizan interacciones inespecíficas no deseadas. Los expertos en la materia conocen sistemas y técnicas adecuadas para optimizarlos.

En el contexto de la presente invención, el término "contactar" o "contacto" incluye todas las medidas o etapas que permiten la interacción entre el analito y el soporte sólido. El contacto se realiza de manera que los componentes diana en el analito pueden interactuar o unirse al compuesto inmovilizado. La unión entre el componente diana y el compuesto será preferiblemente una unión reversible no covalente, por ejemplo, unión mediante puentes de sal, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas o una combinación de los mismos.

Los métodos de la presente invención permiten la evaluación o determinación directa cualitativa y/o cuantitativa de la interacción de un compuesto de interés con componentes diana en un analito, tal como un lisado o extracto celular o tisular.

En un primer aspecto de la invención, también denominado en la presente memoria como método de acuerdo con IVA1 (*In Vitro Association*, composición 1), la inmovilización del compuesto de interés en el soporte sólido se realiza a diferentes concentraciones en combinación con diferentes etapas de purificación por afinidad paralelas o consecutivas, tales como las etapas de contacto (a), (b) y (c) mencionadas anteriormente, que permiten determinar la afinidad del componente diana a dicho compuesto.

En el contexto de la presente invención son adecuadas diversas relaciones de concentración en las que el compuesto de interés está inmovilizado en el soporte sólido. Las relaciones preferidas de las concentraciones en las etapas anteriormente mencionadas (a), (b) y (c) se seleccionan de las relaciones de aproximadamente 1:5:25 o aproximadamente 1:10:100. Sin embargo, otras relaciones son igualmente adecuadas, por ejemplo relaciones de aproximadamente 1:3:9, aproximadamente 1:4:16, aproximadamente 1:6:36, aproximadamente 1:7:49, aproximadamente 1:8:64 o aproximadamente 1:9:81.

Determinando la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a), (b) y (c) y comparando las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en estas etapas, el método permite determinar cualitativa y, hasta cierto punto, cuantitativamente la afinidad de la unión del componente diana en el analito al compuesto de interés.

En los métodos de acuerdo con IVA1, la cantidad de componente diana unido al soporte sólido se refleja, por ejemplo, en las intensidades de señal determinadas en la etapa (d), medidas, por ejemplo, por MS. Cantidades crecientes del componente diana unido al compuesto de las etapas (a), (b) y (c), como se refleja mediante intensidades de señal crecientes, indican que el componente diana puede ser uno con afinidad de unión solamente baja o media para el compuesto unido al soporte sólido. Sólo pequeños aumentos de las cantidades de componente diana unido al compuesto en las etapas (a), (b) y (c), como se refleja mediante intensidades de señal similares, son indicativos de componentes diana con afinidad de unión alta por el compuesto unido al soporte sólido. Si las cantidades de componente diana unido al compuesto de las etapas (a), (b) y (c) son iguales, lo que puede visualizarse mediante intensidades de señal iguales, esto puede ser indicativo de unión muy fuerte al compuesto unido al soporte sólido o unión inespecífica al material sólido.

Para una determinación precisa de valores K_d con los métodos de acuerdo con IVA1, la concentración del inhibidor inmovilizado preferiblemente debería estar en exceso molar de la concentración de su componente o componentes diana correspondientes en el analito, preferiblemente en al menos un exceso molar de dos veces. Sin embargo, incluso en condiciones en las que la concentración de ligando inmovilizado es limitante, el ensayo aún clasificará diferentes componentes diana de acuerdo con sus afinidades por el ligando inmovilizado. Por lo tanto, un exceso molar de ligando es conveniente y un requerimiento opcional, pero no esencial.

El aspecto anterior de la invención se demuestra ejemplarmente en la Fig. 1a (IVA1, *In Vitro* Association, Composición 1). Se lleva a cabo un método de acuerdo con este aspecto, preferiblemente mediante el uso de lisados celulares de tres cultivos de las mismas células, que difieren, sin embargo, en que se han marcado metabólicamente con diferente marcaje isotópico. Estos lisados marcados de forma diferente se procesan en el método como alícuotas separadas del mismo analito. Específicamente, se ponen en contacto con un compuesto inhibidor de interés (en la Figura se usa V16742) inmovilizado a diferentes concentraciones en un soporte sólido (en la Figura en una relación de 1:5:25). Después de asociación *in vitro* con el ligando, las proteínas de cada alícuota unidas al soporte sólido se combinan y analizan mediante LC-MS/MS. Posteriormente, la abundancia relativa de las proteínas que interactúan puede cuantificarse determinando las relaciones de intensidad de los iones peptídicos marcados con isótopos derivados de las tres incubaciones paralelas (Fig. 1a).

Se pondrá de manifiesto que de acuerdo con el aspecto anterior de la invención, ciertas determinaciones cualitativas, pero también cuantitativas, pueden realizarse con respecto a la afinidad del componente diana al compuesto de interés.

Como se muestra esquemáticamente en la Figura para un componente diana representativo retenido con afinidad media o baja por V16742, las intensidades reflejan la unión de componente diana aumentada desde menores a mayores concentraciones del compuesto inhibidor inmovilizado (Fig. 1a-ii).

A partir de este experimento, no puede deducirse con certeza, sin embargo, qué porcentaje de un componente celular diana se retiene a la máxima concentración del compuesto inhibidor inmovilizado y, por lo tanto, puede ser difícil determinar un valor K_d (constante de disociación) para la interacción de un inhibidor-componente diana (Fig. 1a-ii).

En el caso de componentes diana con alta afinidad, que ya están agotados del analito a concentración de inhibidor media, la intensidad no aumenta adicionalmente con más inhibidor presente en las perlas de afinidad (Fig. 1a-iii). Si las intensidades de señal (que representan cantidades de componente

diana relativas) son iguales para las tres asociaciones *in vitro*, esto podría, sin embargo, deberse a unión a componente diana con muy alta afinidad o indicar unión “de fondo” de un componente diana, que se retiene a través de interacciones débiles, inespecíficas con el material de soporte sólido (Fig. 1a-iv).

5

En otro aspecto de la invención, también denominado en la presente memoria como método de acuerdo con IVA2 (*In Vitro Association*, Composición 2), se proporciona un método que permite distinguir entre estos dos posibles escenarios. Este método comprende realizar dos ciclos de etapas de asociación *in vitro* consecutivas de un componente diana dentro de un analito con un compuesto inmovilizado en un soporte sólido a una alta concentración (por ejemplo, la concentración más alta usada o determinada en un método de acuerdo con el primer aspecto de la invención) y comparar la cantidad de componente diana unido en el segundo ciclo de estas etapas con la cantidad de componente diana unido en una asociación paralela *in vitro* con sólo una etapa de asociación (Fig. 1b-i).

15

De acuerdo con este método, se usan de nuevo lisados celulares de tres cultivos de las mismas células que difieren, sin embargo, en su marcaje isotópico metabólico, procesándose dichos lisados de nuevo como alícuotas separadas del mismo analito. Una primera alícuota se pone en contacto con el soporte sólido con el compuesto de interés (aquí: V16742) inmovilizado a una concentración alta. Después de permitir la asociación *in vitro*, el sobrenadante se separa del soporte sólido y se pone de nuevo en contacto con el material de soporte sólido del tipo mencionado anteriormente con el compuesto inmovilizado a una concentración alta. El método también incluye poner en contacto una segunda alícuota marcada de manera diferente con el tipo anteriormente mencionado del material de soporte sólido con el compuesto inmovilizado a una alta concentración. Un control negativo, con una tercera alícuota marcada de manera diferente en contacto con el soporte sólido que está, sin embargo, desprovisto del compuesto anterior inmovilizado en él se ejecuta en paralelo. Las proteínas de la primera y tercera alícuotas unidas al soporte sólido y las proteínas de la segunda alícuota unidas al soporte sólido en la etapa de volver a poner en contacto se combinan, se analizan mediante LC-MS/MS y se cuantifica la abundancia relativa de proteínas interactuantes determinando las relaciones de intensidad de los iones peptídicos marcados con isótopo derivados de las tres incubaciones paralelas (Fig. 1b).

20

25

30

En contraste con los componentes diana de interacción débil del analito, los componentes diana con una mayor afinidad por el compuesto inmovilizado, por ejemplo, un compuesto inhibidor, se agotan en su mayor parte en la primera etapa de contacto a la que se somete la segunda alícuota.

35

Por comparación cuantitativa con los componentes diana marcados diferencialmente retenidos del sobrenadante en el segundo ciclo de purificación por afinidad con el mismo soporte sólido que tiene un compuesto inmovilizado en él, por ejemplo, perlas inhibidoras, el porcentaje de unión del componente diana a la mayor concentración de compuesto inhibidor puede ahora calcularse (ejemplos para 10% y 75% de unión dados en la Fig. 1b-ii y Fig. 1b-iii respectivamente). El factor de enriquecimiento para cada diana específicamente unida a la resina de afinidad V16742 puede calcularse de acuerdo con la fórmula $E_n = (1-r_n) \times 100$ en la que, r_n representa la relación de la unión observada para la diana n en el ciclo 2 contra el ciclo 1 de la composición IVA2 con resina de afinidad V16742 y E_n es el factor de enriquecimiento porcentual para la diana n .

40

45

Además, el uso de soporte sólido que no tiene compuesto unido a él, es decir, un control, proporciona un medio para identificar los componentes diana del analito, que no interactúan específicamente con el compuesto inmovilizado (Fig. 1b-iv).

50

Para permitir la determinación de afinidades de unión mediante los métodos de la invención de acuerdo con IVA2, el compuesto inmovilizado en el soporte sólido debería estar presente durante las etapas de contacto en exceso molar en comparación con el componente diana.

55

En los métodos de acuerdo con IVA2, la cantidad de componente diana unido al soporte sólido se refleja, por ejemplo, en las intensidades de señal determinadas en la etapa (d), medidas, por ejemplo, mediante MS. Las cantidades decrecientes de componente diana unido al compuesto en las etapas (a) y (c) se reflejan en intensidades de señal decrecientes. El grado de disminución es indicativo de la afinidad de unión del componente diana por el compuesto unido al soporte sólido. Si sólo existe una pequeña diferencia (disminución) en las cantidades unidas en las etapas (a) y (c), esto indica una unión de afinidad baja, mientras que una gran diferencia (disminución) indica que el componente diana se une con afinidad media o alta al compuesto unido al soporte sólido. Si las cantidades de

60

componente diana unido al compuesto en las etapas (a), (b) y (c) son iguales, esto es indicativo de unión de fondo o inespecífica.

5 Para una determinación más precisa de valores de K_d , la concentración del inhibidor inmovilizado está preferiblemente en un exceso molar de al menos dos veces sobre la concentración de su componente o componentes diana en el analito. Sin embargo, incluso en condiciones en las que la concentración de ligando inmovilizado es limitante, el ensayo aún clasificará los componentes diana de acuerdo con sus afinidades para el ligando inmovilizado. Por lo tanto, es conveniente un exceso molar de ligando y es un requerimiento opcional, pero no esencial.

10 Puede realizarse un experimento control adicional para confirmar que el compuesto inmovilizado no es limitante en los métodos IVA de la invención. Como se muestra en la Fig. 1c-i, los lisados celulares (por ejemplo, de células HeLa) marcados diferencialmente (por ejemplo, codificados con SILAC), preferiblemente del mismo volumen, que contienen diferentes cantidades de proteína celular pueden incubarse con perlas del tipo usado de acuerdo con IVA1 o IVA2, por ejemplo, las perlas que contienen la concentración más baja de ligando inmovilizado. Si la relación de intensidades de señal derivadas de proteínas diana que interactúan con ligando corresponde a la relación de la concentraciones de proteína inicial, puede concluirse que la concentración de ligando inmovilizado ha estado presente en exceso molar con respecto a sus proteínas diana en el ensayo de unión.

20 En un tercer aspecto de la invención, también denominado en la presente memoria como método de competidor IVA (*In Vitro Association*), la afinidad de unión de un compuesto competidor de interés puede determinarse para cualquier componente diana en un analito con respecto al cual la afinidad de unión (por ejemplo, en términos de un valor de K_d) de un compuesto inmovilizado (por ejemplo un inhibidor inmovilizado) se ha determinado, o se determinará, mediante competición dependiente de concentración. La afinidad de unión del compuesto inmovilizado puede, por ejemplo, determinarse mediante cualquiera de los métodos de la invención de acuerdo con IVA1 y/o IVA2. Una ventaja de este método es que el compuesto competidor no tiene que estar inmovilizado en este método.

30 El tiempo de incubación en las etapas de contacto de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención (es decir, ya sean los métodos de acuerdo con IVA1 o IVA2 o bien los métodos de competidor IVA) debería preferiblemente ser suficientemente largo como para alcanzar equilibrios de unión para interacciones diana-inhibidor. Los inventores han verificado experimentalmente que este es típicamente el caso después de un tiempo de incubación de 2 horas y media. Sin embargo, los equilibrios de unión también pueden alcanzarse con tiempos de incubación más cortos. Las concentraciones de tampón, sales y otros componentes tales como agentes quelantes tales como EDTA y EGTA o cofactores adicionales pueden en principio variarse a lo largo de un amplio intervalo de concentración. Además, las etapas de contacto pueden hacerse a diferentes temperaturas. Las temperaturas preferidas se seleccionan de aproximadamente 4°C, aproximadamente 15°C, temperatura ambiente, aproximadamente 25°C, aproximadamente 37°C y aproximadamente 42°C, siendo particularmente preferidas aproximadamente 4°C, temperatura ambiente y aproximadamente 37°C.

45 Las etapas de contacto de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención se realizan preferiblemente en condiciones fisiológicas o esencialmente fisiológicas. Esto permite imitar la situación *in vivo* tan estrechamente como sea posible. La posibilidad de trabajar en condiciones fisiológicas o esencialmente fisiológicas es una de las ventajas de los métodos de la presente invención, en contraste con otros métodos de acuerdo con el estado de la técnica que dan como resultado fácilmente resultados de falso positivo. El contacto se realiza preferiblemente usando un tampón adecuado y, opcionalmente, un cofactor, tal como calcio, magnesio, potasio, NAD⁺/NADH, GMPc, NADP⁺/NADPH, ATP, ADP, AMPc, y similares. Los cofactores pueden mejorar significativamente la formación de complejos y proteomas y a la vez la interacción del proteoma y/o los complejos con el compuesto potencialmente interactuante. Como se usa en la presente memoria la expresión "condiciones fisiológicas" se refiere a temperatura, pH, fuerza iónica, viscosidad y parámetros bioquímicos similares que son compatibles con un organismo viable y/o que existen típicamente intracelularmente en una célula viable cultivada, tal como una célula de levadura o una célula mayor eucariota, tal como una célula de mamífero.

60 Por ejemplo, las condiciones intracelulares en una célula de levadura crecida en condiciones típicas de cultivo en laboratorio son condiciones fisiológicas. Las condiciones de reacción *in vitro* adecuadas para combinaciones de transcripción *in vitro* son generalmente condiciones fisiológicas. En general, las condiciones fisiológicas *in vitro* comprenden NaCl o KCl 50-200 mM, pH 6,5-8,5, 20-45°C y

cationes divalentes 0,001-10 mM (por ejemplo, Mg^{++} , Ca^{++}); preferiblemente NaCl o KCl aproximadamente 150 mM, pH 7,2-7,6, catión divalente 5 mM y con frecuencia incluyen 0,01-1,0 por ciento de proteína inespecífica (por ejemplo, BSA). Un detergente no iónico (Tween, NP-40, Triton X-100) puede con frecuencia estar presente, habitualmente de aproximadamente 0,001 a 2%, típicamente de 0,05 a 0,2% (v/v). Las condiciones particularmente adecuadas pueden ser seleccionadas fácilmente por el facultativo experto de acuerdo con métodos convencionales. Como guía general, pueden usarse las siguientes soluciones acuosas tamponadas: NaCl 10-1200 mM, Tris/HCl 5-50 mM, pH 5-8, con adición opcional de catión o cationes divalentes y/o quelantes metálicos y/o detergentes no iónicos y/o fracciones de membrana y/o agentes antiespuma y/o centelleantes.

"Condiciones esencialmente fisiológicas" se pretende que se refiera a, por ejemplo, un pH de 6,5 a 7,5, preferiblemente de 7,0 a 7,5 y/o una concentración de tampón de 10 a 50 mM, preferiblemente de 25 a 50 mM y/o una concentración de sales monovalentes (por ejemplo, Na o K) de 120 a 170 mM, preferiblemente 150 mM. Adicionalmente puede estar presente sales divalentes (por ejemplo, Mg o Ca) a una concentración de 1 a 5 mM, preferiblemente 1 a 2 mM, en las que más preferiblemente el tampón se selecciona del grupo que consiste en Tris-HCl o HEPES.

Las etapas de contacto de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención pueden, sin embargo, también realizarse ventajosamente en presencia de mayores concentraciones de sal (por ejemplo, hasta 1,2 M) para reducir la unión inespecífica de proteínas de fondo o a temperatura más baja (por ejemplo, 4°C) para asegurar estabilidad de las proteínas y evitar agregación proteica.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos de la invención pueden incluir una etapa de eluir el analito del soporte sólido con o sin un compuesto unido a él. Preferiblemente, los componentes diana de la presente invención se eluyen del soporte sólido antes de combinarse en una muestra, basándose en la cual se realiza la etapa de detección.

Los métodos de elución adecuados se conocen principalmente en la técnica y dependen de la naturaleza de la interacción. Principalmente, los cambios de fuerza iónica, el valor de pH, la temperatura o la incubación con detergentes son adecuados para disociar el componente diana del analito del compuesto inmovilizado o el soporte sólido (en caso de interacción inespecífica). La aplicación de un tampón de elución puede disociar parejas de unión mediante valores de pH extremos (pH alto o bajo; por ejemplo, disminución del pH mediante el uso de citrato 0,1 M, pH 2-3), cambio de fuerza iónica (por ejemplo, alta concentración de sal usando NaI, KI, $MgCl_2$ o KCl), agentes reductores de polaridad que interrumpen las interacciones hidrofóbicas (por ejemplo, dioxano o etilenglicol) o agentes desnaturalizantes (sales caotrópicas o detergentes tales como dodecilsulfato sódico (SDS); para una revisión, véase Subramanian A., 2002, Immunoaffinity chromatography. Mol. Biotechnol. 20(1), 41-47).

Con estos métodos bastante inespecíficos se liberará la mayoría o todos los componentes diana unidos del analito y pueden, por lo tanto, analizarse, por ejemplo, mediante espectrometría de masas (o como alternativa mediante cualquier otro método de detección adecuado, véase posteriormente).

Si el material de soporte está contenido dentro de una columna el material liberado puede recogerse como flujo continuo de columna. En caso de que el material de soporte se mezcle con el analito (denominado procedimiento de lote) puede ser útil o incluso necesaria una etapa de separación adicional tal como centrifugación suave y el material liberado se recoge como sobrenadante. Como alternativa, pueden usarse perlas magnéticas como soporte sólido de modo que las perlas pueden eliminarse de la muestra mediante el uso de un dispositivo magnético.

El experto apreciará que entre las etapas individuales de los métodos de la invención, pueden ser necesarias etapas de lavado. Dicho lavado es parte del conocimiento del experto en la materia. El lavado sirve para eliminar componentes del analito no unidos del soporte sólido. Las interacciones de unión inespecífica (por ejemplo iónica simple) pueden minimizarse mediante la adición de niveles bajos de detergente o mediante ajustes moderados de las concentraciones de sal en el tampón de lavado.

La identificación y cuantificación de los componentes diana eluidos se basa en localización de señal resuelta espacialmente y la magnitud de señal. Pueden usarse muchas tecnologías de dispositivos diferentes que pueden resolver espacialmente una magnitud de señal o tasa de aparición de señal para la detección de unión a componente diana.

Estos métodos pueden emplearse en cualquiera de los métodos de la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, detección de fluorescencia a partir de componentes diana marcados, intercaladores fluorescentes, agentes de unión de hendidura fluorescente, balizas moleculares, radioisótopos, potenciales de superficie, productos de colores, dianas marcadas con enzimas, dianas marcadas con anticuerpos y dianas marcadas con partículas de oro.

Preferiblemente, los componentes diana eluidos se detectan preferiblemente usando métodos de detección de radiactividad, métodos de detección de fluorescencia, métodos de detección de luminiscencia, métodos de detección de tinción, métodos de detección enzimática y espectrometría de masas.

En una realización preferida, los componentes diana eluidos se detectan, es decir, caracterizan y cuantifican, por espectrometría de masas.

La identificación de proteínas con análisis espectrométrico de masas (espectrometría de masas) se conoce en la técnica (Shevchenko *et al.*, 1996, *Analytical Chemistry* 68: 850-858; Mann *et al.*, 2001, *Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry*, *Annual Review of Biochemistry* 70, 437-473) y se ilustra adicionalmente en la sección ejemplo.

Los componentes diana en el analito se marcan ventajosamente con un marcador detectable. Como se ha mencionado anteriormente, en una realización preferida de los métodos de la invención el marcador detectable es diferente en cada alícuota del analito.

Puede usarse en este sentido el procedimiento SILAC (marcaje isotópico estable con aminoácidos en cultivo celular) establecido para el análisis cuantitativo de proteína mediante espectrometría de masas. Por ejemplo, pueden estar codificadas tres poblaciones de células pueden estar codificadas por SILAC usando tres combinaciones distintas de arginina y lisina marcadas con isótopos ($\text{Arg}^0/\text{Lys}^0$, $\text{Arg}^6/\text{Lys}^4$, $\text{Arg}^{10}/\text{Lys}^8$). Sin embargo, los métodos o etapas de la presente invención también pueden combinarse con cualquier otra estrategia para cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Otros marcadores detectables pueden, sin embargo, emplearse también en los métodos de la invención. Por ejemplo, los marcadores detectables adecuados se seleccionan del grupo de radiomarcadores, tales como ^{13}C , ^{32}P , ^{35}S , ^3H , ^{129}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In y similares, marcadores de tinción, marcadores que pueden detectarse con anticuerpos, marcadores enzimáticos y marcadores que tienen una masa detectable. Se describen ejemplos para el uso de espectroscopía de masas en análisis proteómico en Ho Y, *et al.* (sin marcadores) ("Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry" *Nature* 2002, Jan. 10; 415(6868): 180-3.); Gu S, *et al.* ("Precise peptide sequencing and protein quantification in the human proteome through in vivo lysine-specific mass tagging". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003, Jan; 14(1):1-7) y Williams C y Addona TA ("The integration of SPR biosensors with mass spectrometry: possible applications for proteome analysis." *Trends Biotechnol.* 2000 Feb; 18(2):45-8).

El marcador del componente diana también puede seleccionarse de marcadores fosforescentes, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, fosfatasas, avidina, estreptavidina, biotina, marcadores por el método de TAP y peroxidasa. Además de TAG, otros marcadores son diana Arg, dominio de unión a calmodulina, péptido de unión a celulosa, DsbA, etiqueta c-myc, glutatión S-transferasa, etiqueta FLAG, etiqueta HAT, etiqueta His, proteína de unión a maltosa, NusA, etiqueta S, etiqueta SBP, etiqueta Strep y tioredoxina. Los usos de estas etiquetas se describen exhaustivamente en la bibliografía (por ejemplo, en Terpe K., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003 Jan; 60(5):523-33).

Como se ha indicado previamente en la presente memoria, los métodos de la invención pueden realizarse al completo o al menos en parte de un modo de alto rendimiento.

Los métodos de la presente invención permiten la determinación de valores de K_d para todos los componentes diana identificados en el intervalo de concentración cubierto por las diferentes concentraciones de compuesto (densidades) del compuesto inmovilizado. Para los componentes diana con afinidad muy alta, puede estimarse que los valores de K_d son más bajos que los correspondientes a la concentración de compuesto inmovilizado más baja, mientras que para dianas de interacción bastante débil con menos del 50% de unión a la concentración de compuesto más alta, puede concluirse que los valores de K_d están por encima de un cierto umbral. Además de recuperar

información cuantitativa acerca de sensibilidades de proteína diana al compuesto inmovilizado, los agentes de unión de fondo pueden distinguirse fácilmente de las proteínas diana retenidas específicamente.

5 La presente invención resuelve los principales defectos de los procedimientos proteómicos químicos previos basados en purificaciones por afinidad de inhibidor inmovilizado. Usando extracto de células HeLa, el análisis químico cuantitativo descrito de V16742 inmovilizado dio como resultado la determinación de K_d para 131 dianas celulares que incluían 96 proteína quinasas identificadas y cuantificadas mediante espectrometría de masas (Fig. 2b y Tabla 1). La distribución de dianas de quinasas identificadas en el árbol del quinoma sugiere que V16742 es un inhibidor bastante no selectivo (Fig. 2d). Las dianas no quinasas también pueden identificarse por el método de la invención. Los métodos de la invención pueden adaptarse para cualquier tipo de ligando de afinidad, que puede inmovilizarse en un soporte sólido.

15 Para confirmar los resultados de espectrometría de masas, los lisados totales de células HeLa se sometieron a IVA1 e IVA2 con perlas de control o perlas V16742. Las proteínas retenidas en las perlas se inmunotransfirieron con anticuerpos específicos para JNK2, RIPK2, ERK2 y ROCK2, variando las afinidades de dianas de altas a muy bajas como se identificó/predijo mediante espectrometría de masas. Las quinasas interactuaron específicamente con la matriz de V16742 (Figura 2c) con patrones de acuerdo con los predichos por el diseño experimental (Figura 1) así como los datos cuantitativos obtenidos mediante la espectrometría de masas (Tabla 1).

25 La información de los valores K_d diana para un inhibidor inmovilizado permite adicionalmente establecer una plataforma proteómica química cuantitativa para un análisis de selectividad rápido de compuestos de ensayo libres contra esas dianas, que son retenidas por el inhibidor inmovilizado. Para establecer este enfoque de cribado, se añadieron concentraciones crecientes del inhibidor de quinasas SB203580 a asociaciones *in vitro* con lisados celulares marcados diferencialmente con SILAC y el inhibidor bastante no selectivo V16742 inmovilizado a la densidad más alta (Fig. 3a). Se ensayaron diferentes concentraciones (100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) de SB203580 con respecto a su capacidad para competir con la interacción entre la lista completa de dianas quinasas/no quinasas y V16742 inmovilizada. La prevención dependiente de dosis de unión de proteínas diana SB203580 al inhibidor inmovilizado se midió mediante MS cuantitativa y pudo usarse para determinar las concentraciones IC_{50} específicas de diana para SB203580, a las que el compuesto libre inhibió la unión a V16742 inmovilizada en un 50%. Los espectros representativos para la RIPK2, la diana que compete más fuertemente con SB203580 con respecto a su interacción con V16742 inmovilizada, se muestra en la Fig. 3b. Posteriormente, usando la ecuación clásica de Cheng-Prusoff, los valores de IC_{50} para SB203580 y los valores de K_d previamente determinados para V16742 inmovilizada se pudieron usar para determinar los valores de K_d para dianas SB203580 representadas en la resina de afinidad V16742 (Tabla 2).

40 Una vez más, los resultados de espectrometría de masas se confirmaron mediante inmunotransferencia. Las reacciones IVA en presencia de concentraciones crecientes de SB203580 se exploraron con anticuerpos específicos para RIPK2, GAK, CK1 α , GSK3 β y JNK2 las dianas de SB203580 identificadas/predichas por espectrometría de masas. La interacción entre las quinasas y la V16742 inmovilizada competía específicamente con SB203580 de un modo dependiente de dosis (Fig. 3c) validando los resultados de espectrometría de masas cuantitativa (Tabla 2) añadiendo de este modo a la prueba de concepto.

50 Así pues, una vez que se han determinado los valores de K_d para unión a proteína diana de un inhibidor o inhibidores de quinasas no selectivos (o una combinación de no selectivos) para las proteínas en un extracto biológico mediante la estrategia proteómica química descrita anteriormente, esta información puede usarse para establecer un panel de selectividad, en el que todas las proteínas retenidas pueden ensayarse rápidamente con respecto a sus sensibilidades a compuestos de interés (que no tienen que estar ellos mismos inmovilizados).

55 El inhibidor de quinasas clínico gefitinib y su derivado inmovilizado AX14596 se emplearon para idear adicionalmente el concepto de proteómica química de la presente invención que integra la identificación diana de amplio proteoma imparcial y mediciones de afinidad por diana controladas por calidad. Los lisados celulares diferencialmente codificados por SILAC se incubaron tanto con las perlas de inhibidor que presentan AX14596 inmovilizado como resina de control que carece de ligando. En paralelo, el sobrenadante de la primera etapa de unión se sometió a una segunda incubación con la resina AX14596 (Fig. 4). Las tres fracciones de elución resultantes se combinaron,

se resolvieron por electroforesis en gel, se digirieron proteolíticamente y se cuantificó la abundancia relativa de las proteínas retenidas. Se identificaron proteínas que muestran unión considerable a la resina de control como interactores no específicos y, por tanto, no se consideraron más. La relación r para la cantidad relativa de proteína retenida en la segunda ronda frente a la primera de unión a perlas AX14596 es igual a la fracción de una diana que no fue secuestrada por el inhibidor inmovilizado, mientras que $1-r$ indica la proporción de diana que en realidad se unió a la resina de afinidad (Fig. 4a, Fig. 6a y 6b). Estas relaciones específicas para diana fueron similares en experimentos “de cambio de marca” (Fig. 6a y 6c). El equilibrio de unión se determinó en experimentos con SILAC de control paralelo, además del exceso del compuesto inmovilizado sobre sus dianas celulares, siendo el exceso preferentemente un exceso molar (Fig. 7 y Fig. 8).

Usando la concentración espectrofotométricamente determinada del compuesto inmovilizado (por ejemplo, AX14596), las constantes de disociación (valores de K_i) pueden calcularse para proporcionar una medida cuantitativa de las afinidades diana respectivas para el compuesto inmovilizado (Fig. 4, Tablas 3-5).

Para comprobar afinidades por diana potencialmente alteradas debido a modificación y/o inmovilización del compuesto parental, el efecto de concentraciones crecientes de compuesto sobre la unión de diana al compuesto modificado y/o inmovilizado (por ejemplo, el efecto de concentraciones crecientes de gefitinib sobre la unión de diana a perlas AX14596; véase la Fig. 4) puede monitorizarse, por ejemplo, en experimentos de competición, preferentemente en experimentos de competición basados en SILAC. En el ejemplo de los experimentos representados en la Fig. 4, la pre-incubación de lisado con tanto gefitinib “libre” como perlas AX14596 antes de la adición del reactivo de competición dio resultados similares, que muestran la unión en equilibrio bajo las condiciones de ensayo (Fig. 9). La concentración de gefitinib requerida para la inhibición al 50% de la unión de diana a perlas AX14596, $CI_{50}(Gef.)$, junto con la concentración previamente determinada de su derivado inmovilizado, además de los valores de K_i de diana para su derivado inmovilizado, se usó para calcular las constantes de disociación específicas para diana $K_i(Gef.)$ para gefitinib “libre” según la ecuación de Cheng-Prusoff (Fig. 4 y Tabla 4). Estas constantes de disociación estuvieron en buena correlación con valores de K_i determinados en ensayos de quinasa in vitro usando enzimas recombinantes (Tabla 3). Estos resultados confirman que la estrategia de proteómica química cuantitativa de la invención es un procedimiento adecuado para permitir el perfilado cuantitativo directo de compuestos, por ejemplo, inhibidores de quinasas de molécula pequeña, contra diversos analitos, por ejemplo, extractos biológicos.

Además, la identificación de la NADH difosfatasa NUDT12 y bleomicina hidrolasa como posibles dianas celulares de gefitinib indica que la cuantificación no está limitada a proteínas quinasas (Abdelraheim, S.R., Spiller, D.G. & McLennan, A.G. Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix familia: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein. *Biochem J* 374, 329-335 (2003); Ramotar, D. & Wang, H. Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 43, 213-224 (2003)).

En una implementación alternativa del enfoque proteómico químico según la invención, el inhibidor de quinasas VI16742 basado en pirido[2,3-d]pirimidina ampliamente selectivo se ha usado para captura por afinidad (Fig. 10a). Usando la misma estrategia cuantitativa que se ha descrito anteriormente, los valores de K_i para VI16742 inmovilizado podrían determinarse para aproximadamente 130 proteínas quinasas y aproximadamente 25 otras enzimas de unión a nucleótido (Fig. 5a y Tablas 7 a 8). Como se muestra por análisis de ontología génica, las funciones moleculares correspondientes se sobrerepresentaron altamente en proteínas específicamente retenidas por la resina inhibidora (Fig. 10b).

Las proteínas que interaccionan con VI16742 compusieron un panel de selección para el perfilado de inhibidores cuantitativos contra un gran número de proteínas de unión a nucleótidos derivados de su entorno celular nativo. La resina VI16742 con solo una molécula de captura inmovilizada permitió la evaluación cuantitativa de un número casi similar de proteínas quinasas en un extracto celular como una mezcla de resinas previamente descrita de siete ligandos distintos (Bantscheff, M. y col. *Nat. Biotechnol.* 25, 1035-1044 (2007)).

La competición de un compuesto de interés por la unión a componente diana en un analito, por ejemplo, del inhibidor de quinasas SB203580, puede evaluarse cuantitativamente, por ejemplo, por experimentos con SILAC, en un modo dependiente de la concentración (Fig. 5b). Los valores de CI_{50} resultantes conjuntamente con los datos cuantitativos para VI16742 inmovilizado permitieron

determinar constantes de disociación para SB203580, como se muestra para RIPK2, GAK, GSK3 β y otras dianas de quinasa (Fig. 5b, Tabla 8). Los valores de K_i determinados para SB203580 y gefitinib por el enfoque proteómico de la invención se correspondieron bien con los datos de ensayos de quinasa recombinantes, que indican una mejora significativa en la precisión de las mediciones de afinidad por diana celular (Tabla 6 y Fig. 11).

Sin embargo, el procedimiento de la invención no se limita conceptualmente a análisis de inhibidores de quinasas, pero puede aplicarse, por ejemplo, a cualquier otra clase de moléculas pequeñas

Usando la tecnología proteómica química de acuerdo con los métodos de la presente invención, pueden evaluarse al mismo tiempo las moléculas candidatas, sus dianas moleculares, mecanismos de acción, selectividad y eficacia, mejorando así dramáticamente el procedimiento de descubrimiento de fármacos y disminuyendo la tasa de desgaste de los compuestos en pipelines de desarrollo clínicos.

El uso de compuestos tipo fármaco inmovilizados en un soporte sólido como sondas de afinidad para identificar y cuantificar la unión de proteínas directamente desde lisados celulares o muestras tisulares ofrece la ventaja de identificar las proteínas que son inherentemente susceptibles de convertirse en fármacos. Así pues, la aplicación de esta tecnología para buscar nuevos miembros de una familia diana da como resultado no sólo la identificación de nuevos miembros diana sino también la identificación de compuestos de alta afinidad altamente selectivos para la diana.

La presente invención describe el uso de los métodos descritos en la presente memoria como una herramienta general de descubrimiento de fármacos. Este enfoque proteómico químico facilita el entendimiento de dianas proteicas funcionales y proporciona herramientas para diseccionar complejos procesos celulares.

La presente invención describe el uso de los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria para la identificación de nuevas indicaciones para fármacos aprobados existentes. Con el propósito de ilustrar considérese un fármaco que es un inhibidor de quinasa. Dado el gran número de quinasas que se espera que existan, es altamente probable que este compuesto inhiba otras dianas de quinasas oportunistas implicadas en patologías de más amplio impacto. Por lo tanto, es razonable predecir que el mercado potencial de este compuesto podría aumentar en gran medida.

La presente invención describe el uso de los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria para definir el mecanismo de acción de un candidato temprano a fármaco. En el escenario en el que un candidato a fármaco muestra un efecto biológico interesante, pero para el que se desconoce el mecanismo molecular general, la tecnología puede usarse para permitir una optimización racional de la actividad. Por ejemplo, si una compañía tiene una molécula candidata pequeña o una clase de moléculas que muestran un efecto biológico interesante y eficacia en un modelo de enfermedad dado, pero el mecanismo exacto de acción no se entiende, la identificación de dianas de efecto relacionado servirá para facilitar su desarrollo a fármacos. Si los datos de relación estructura-actividad están disponibles, pueden identificarse regiones de la molécula que pueden modificarse sin suprimir la actividad biológica. La inmovilización de este candidato a fármaco permite que un análisis proteómico identifique la(s) diana(s) del compuesto. La información de este tipo es de tremendo valor en el procedimiento de optimización, especialmente cuando la diana de interés es responsable del diseño de fármaco basado en estructura.

La presente invención describe el uso de los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria para su perfilación ADME/Tox. La tecnología descrita en la presente memoria puede usarse para generar perfiles de toxicidad y evaluar las propiedades ADME de candidatos a fármaco antes de que se introduzcan a la clínica. Las propiedades farmacocinéticas de un candidato a fármaco pueden evaluarse mediante la exposición del compuesto o clase de compuesto a una batería/panel de proteomas relevantes ADME/Tox (es decir, proteínas de unión a suero para su uso en, por ejemplo, la evaluación de biodisponibilidad de un fármaco potencial), que proporciona información importante útil en la priorización de candidatos y las etapas de optimización de candidatos. Dadas las varias posibles clases de candidatos a llevar a optimización de candidatos, una rápida evaluación de las propiedades de cada clase ayuda al químico a seleccionar en qué clase centrarse. La clase con mayor probabilidad de tener buenas propiedades ADME tiene más probabilidad de generar un candidato a fármaco que tiene las propiedades deseadas para el desarrollo de fármaco. De igual modo, el conocimiento de las dianas secundarias y terciarias para dichos compuestos reducirá la aparición de efectos secundarios potencialmente tóxicos, incrementando de este modo la tasa de éxito del desarrollo clínico. En

general, esta técnica puede usarse como un filtro para priorizar qué compuestos deben llevarse a estudios farmacocinéticos y toxicológicos más rigurosos y caros.

- 5 Así pues, los métodos para cuantificación en todo el proteoma de unión de moléculas pequeñas a proteínas diana celulares descritos y reivindicados en la presente memoria pueden aplicarse para resolver problemas fundamentales y proporcionar servicios a la industria farmacéutica.

La invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

10 Ejemplo 1: Síntesis de Compuestos y Unión Covalente

- El inhibidor de quinasa V16742 se sintetizó en base a las rutas sintéticas descritas. El inhibidor de quinasa V16742 se sintetizó basándose en rutas de síntesis descritas (Moloney, G.P. y col. A novel series of 2,5-substituted tryptamine derivatives as vascular 5HT1B/1D receptor antagonists. J Med Chem 40, 2347-62 (1997). Barvian, M. y col. Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. J Med Chem 43, 4606-16 (2000)). AX14596 y gefitinib se sintetizaron como se ha descrito previamente (Brehmer, D. y col. Cellular targets of gefitinib. Cancer Res 65, 379-382 (2005)). V16742 se acopló a perlas de Sepharose activadas por epoxi a tres concentraciones diferentes y la concentración relativa de inhibidor covalentemente inmovilizado sobre las distintas resinas se determinó mediante espectrofotometría (aquí 1, 5 y 25 veces de la menor concentración). Dos volúmenes de AX14596 a una concentración de 2,5 mM se acoplaron a un volumen de perlas de Sepharose activadas por epoxi (GE Healthcare) como se ha descrito previamente (Wissing, J. y col. Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry. Mol Cell Proteomics 6, 537-547 (2007)). La concentración de inhibidor covalentemente inmovilizado se determinó espectrofotométricamente midiendo la reducción de la concentración de inhibidor en la fase soluble durante la reacción de acoplamiento.

Ejemplo 2: Cultivo Celular y Experimentos de Asociación *In Vitro*

- 30 Para el marcaje de isótopo estable con aminoácidos en cultivo celular (SILAC), se cultivaron células HeLa S3 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal dializado al 10% (Invitrogen) y L-arginina (Arg⁰) a 42 mg l⁻¹ y L-lisina (Lys⁰) a 71 mg l⁻¹ no marcadas o cantidades equimolares de las variantes isotópicas L-arginina-U-¹³C₆ (Arg⁶) y L-lisina-²H₄ (Lys⁴) o L-arginina-U-¹³C₆-¹⁴N₄ (Arg¹⁰) y L-lisina-¹³C₆-¹⁵N₂ (Lys⁸) (de Cambridge Isotope Laboratories).
- 35 Usando las tres poblaciones de células marcadas con SILAC y las tres diferentes resinas inhibidoras, se realizaron dos experimentos paralelos denominados IVA1 (*In Vitro Association*, Composición 1) e IVA2 (*In Vitro Association*, Composición 2). Para la asociación *in vitro* con perlas de afinidad del inhibidor, se lisaron células HeLa marcadas diferencialmente en tampón que contenía HEPES 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0,5%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM más aditivos. Después de la centrifugación, los lisados se ajustaron a NaCl 1 M antes de la asociación *in vitro* de 3 mg de lisado de alto contenido salino con 30 µl de matriz V16742 drenada o matriz control según el esquema representado en la Figura 1 durante 2,5 horas a 4°C. En IVA1 las resinas con inhibidor inmovilizado a tres diferentes concentraciones (siendo las concentraciones finales 52 µM, 8,74 µM y 1,87 µM en la reacción) se incubaron con lisados celulares de células HeLa marcadas diferencialmente. En IVA2, los lisados de células HeLa codificados con SILAC se sometieron a dos ciclos paralelos de purificación por afinidad consecutiva a la mayor densidad de ligando en los que el sobrenadante remanente después de la primera IVA se usó para el segundo ciclo de IVA. También se realizó una incubación adicional de lisado de células HeLa con perlas de control desprovistas de inhibidor inmovilizado para distinguir agentes de unión de fondo. Después de tres etapas de lavado con tampón de lisis (dos veces con tampón de lisis que contenía NaCl 1 M y una vez con tampón de lisis) las perlas se eluyeron con 30 µl de tampón de muestra LDS 1,5x a 70°C durante 10 minutos para liberar el material unido a resina.

55 Ejemplo 3: Experimentos IVA en Presencia del Competidor SB203580

- Los lisados de células marcadas diferencialmente con SILAC se preincubaron con concentraciones crecientes del inhibidor de quinasa SB203580 (0 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM) durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad. Estos lisados se sometieron después a asociaciones *in vitro* con las perlas inhibidoras de alta densidad (V16742) durante 2,5 horas a 4°C. Las muestras se procesaron después como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3a: Experimentos con IVA usando gefitinib inmovilizado (=AX14596) en presencia de gefitinib competidor, o usando V16742 inmovilizado en presencia de SB203580 competidor

- 5 Para experimentos de competición, lisados marcados con células SILAC se trataron con diferentes concentraciones de gefitinib (0 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M) o SB203580 (0 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M) durante 30 min antes de la adición de perlas AX14596 o V16742, respectivamente. Alternativamente, los lisados se incubaron con las perlas de inhibidor durante 30 min antes de la adición de los inhibidores libres. Posteriormente, las asociaciones in vitro se realizaron durante otras 2,5 h a 4 °C. En todos los experimentos de asociación in vitro se realizaron tres etapas de lavado (dos con tampón de lisis que contiene NaCl 1 M y una con tampón de lisis) antes de la elución del material unido a resina con 30 μ l de 1,5x tampón de muestra LDS a 70 °C durante 10 min.

Ejemplo 3b: Experimentos con IVA usando dasatinib inmovilizado en presencia de dasatinib competidor

- 15 El inhibidor de quinasas dasatinib se acopló a Sepharose activada con epoxi y células K562 se marcaron con SILAC como se ha descrito en los Ejemplos 1 y 2. Cinco resinas de afinidad por dasatinib con diferentes concentraciones de inhibidor covalentemente inmovilizado (aquí 1, 2, 4, 8 y 16 veces de la menor concentración) se sometieron a experimentos con IVA como se ha descrito en los Ejemplos 2 y 3 en presencia de concentraciones crecientes de dasatinib libre (0 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M). El análisis de masas espectrométrico se realizó como se ha descrito en los Ejemplos 4, 6, 7 y 8. Los valores de CI_{50} para dasatinib libre (CC_{50}) y los valores de K_d para dasatinib inmovilizado se usaron para determinar valores de K_d para dasatinib libre como se describe en el Ejemplo 9.

25 Ejemplo 4: Preparación de Muestra para Espectrometría de Masas

- Se combinaron los eluatos de cromatografía de afinidad se combinaron y se resolvieron mediante electroforesis en geles preparados (NuPage Bis-Tris al 4-12%, Invitrogen) y se visualizaron mediante tinción coloidal de Coomassie (Shevchenko, A., *et al.*, Nat. Protoc. 1, 2856-60 (2006)). Los geles se cortaron después en 3 láminas, seguido de digestión en el gel con tripsina y extracción de péptidos con StageTips (Rappsilber, J. *et al.*, Nat. Protoc. 2, 1896-906 (2007); Olsen, J. V. *et al.*, Cell 127, 635-48 (2006)).

35 Ejemplo 5: Análisis por Inmunotransferencia

- Se realizó la inmunotransferencia de los eluatos de cromatografía de afinidad de las composiciones IVA1 o IVA2 se realizó con los siguientes anticuerpos: anti-caseína quinasa $I\alpha$ de conejo, anti-JNK2 de conejo, anti-ROCK-II de conejo (todos de Cell Signaling Technology, Inc.), anti-GSK3 β , anti-RIPK2, anti-GAK, anti-ERK2 (Santa Cruz).

- Se realizaron las reacciones IVA de lisados celulares HeLa con perlas V16742 inmovilizadas se realizaron en presencia de concentraciones crecientes de SB203580 (0 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M). Para validar los resultados de espectrometría de masas, las proteínas unidas eluidas de la matriz se inmunotransfirieron con anticuerpos específicos contra las dianas de SB203580 concretamente JNK2, RIPK2, ERK2 y ROCK2.

Ejemplo 6: Análisis Espectrométrico de Masas

- 50 Todos los análisis espectrométricos de masas (MS) se realizaron con un sistema HPLC de nanoflujo (Agilent Technologies 1100, Waldbronn, Alemania) conectado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap híbrido (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) equipado con una fuente de iones de nanoelectropulverización (Proxeon Biosystems, Odense, Dinamarca) esencialmente como se ha descrito (Olsen, J. V. *et al.*, Cell 127, 635-48 (2006)). Brevemente, el péptido triptico y las mezclas fosfopeptídicas se separaron en una columna analítica de 15 cm (diámetro interior de 75 μ m) empaquetada interiormente con perlas C18 de 3 μ m (Reprosil-AQ Pur, Dr. Maisch) con un gradiente de 2 horas de acetonitrilo del 5 al 40% en ácido acético al 0,5%. El efluente del HPLC se electropulverizó directamente en el espectrómetro de masas. El instrumento de MS se operó en modo dependiente de datos para que cambiara automáticamente entre MS de exploración completa y adquisición de MS/MS. Se obtuvieron espectros de MS de exploración completa en el estudio (de m/z 300 a 2000) en el orbitrap con resolución $R=60.000$ a m/z 400 (después de la acumulación hasta un "valor diana" de 1.000.000 en la trampa iónica lineal). Los cinco iones peptídicos más intensos con

estados de carga ≥ 2 se aislaron secuencialmente hasta un valor diana de 5.000 y se fragmentaron en la trampa iónica lineal mediante activación multietapa (MSA o pseudo MS³) (Olsen, J. V. *et al.*, Cell 127, 635-48 (2006); Schroeder, M.J. *et al.*, Anal. Chem. 76, 3590-8 (2004)). Todos los espectros iónicos de fragmentos se registraron en la parte LTQ del instrumento. Para todas las mediciones con el detector orbitrap, se usó un ión de masa fija de aire ambiental (m/z 429,08875) para calibración interna como se ha descrito (Olsen, J. V. *et al.*, Mol. Cell Proteomics 4, 2010-21 (2005)). Las condiciones espectrométricas de masa típicas fueron: tensión de pulverización, 2,4 kV; flujo de gas sin envoltura y auxiliar; temperatura capilar caliente, 150°C; energía de colisión normalizada 35% para MSA en LTQ. El umbral de selección iónica fue de 500 conteos para MS². Se usaron un q de activación = 0,25 y un tiempo de activación de 30 ms.

Ejemplo 7: Identificación y Cuantificación de Péptidos

Las listas de picos MS/MS se extrajeron de los archivos MS sin procesar y se exploraron mediante MASCOT contra una base de datos diana/señuelo concatenada (Elias *et al.*, Nat. Methods 2, 667-75 (2005)) consistente en una versión directa y reversa combinada de la base de datos humana IPI versión 3.19. La tolerancia de masa inicial en el modo MS se ajustó a 25 ppm y la tolerancia de masa MS/MS fue de 0,5 Da. Se buscó la carbamidometilación de cisteína como una modificación fija, mientras que se buscaron como modificación la N-acetil proteína, N-piroglutamina, metionina oxidada, fosforilación de serina, treonina y tirosina y marcadores SILAC en arginina y lisina. El archivo de salida html MASCOT se enlazó a los archivos MS sin procesar y se cargaron en el software MSQuant (<http://msquant.sourceforge.net>). Para minimizar la tasa de falso descubrimiento (FDR), se filtraron todas las identificaciones peptídicas mediante umbrales de error de masa y puntuación MASCOT. Se aceptaron péptidos basándose en el criterio de que el número de aciertos directos en la base de datos era al menos 200 veces mayor que el número de aciertos inversos en la base de datos (secuencias peptídicas incorrectas), lo que da un FDR estimado de menos del 1% ($p < 0,01$) (Elias *et al.*, Nat. Methods 2, 667-75 (2005)). Los criterios finales de filtrado a los que $p < 0,01$ era error de masa < 5 ppm (todos los experimentos), puntuación MASCOT ≥ 16 (IVA 1 e IVA2; experimento 1) puntuación de MASCOT ≥ 18 (IVA1, experimento 2), puntuación de MASCOT ≥ 17 (IVA1, experimento 2) o puntuación de MASCOT ≥ 12 (experimento de competición 1 y 2). MSQuant calculó la relación media sobre el tiempo de elución del péptido y las tareas usadas para cuantificación se presentaron visualmente y se validaron. En particular, los criterios de validación incluyeron que el péptido se identificara en la forma correcta SILAC (pesada, media o ligera) y contuviera el número correcto de residuos de lisina y arginina especificados por la diferencia de masas observada en la exploración completa entre las parejas de SILAC.

Ejemplo 8: Análisis de los Datos

Se asignó un molde identificador IPI común a péptidos basándose en el archivo de salida html MASCOT para la composición IVA2 en el primer experimento. Los aciertos de proteínas identificados basándose en péptidos únicos se filtraron con respecto a error de masas y puntuación de MASCOT. Eventualmente, los aciertos identificados tanto en el primer como en el segundo experimentos IVA2 se cuantificaron para la composición IVA2 del primer experimento mediante MSQuant. Después se separaron por filtración los agentes de unión de fondo que mostraron más de un 25% de unión a las perlas de control en comparación con la unión observada en perlas de ligando de alta densidad. Se hizo un siguiente ciclo de clasificación para separar por filtración los aciertos de proteínas que estaban enriquecidas en menos de un 50% en el segundo ciclo IVA en comparación con el primer ciclo IVA. Esto se debe a que en un enriquecimiento por debajo del 50% podía haber errores significativos en la deducción de valores de K_d para las dianas correspondientes. Para las dianas que estaban específicamente enriquecidas en IVA2 del experimento 1, las relaciones que representaban unión de proteínas diana a diversas concentraciones de ligando (V16742) (composición IVA1) se obtuvieron después mediante MSQuant. Se cuantificó también el mismo conjunto de dianas en las composiciones IVA2 e IVA1 de un segundo experimento independiente.

Para los experimentos de competición con SB203580, los análisis de datos eran esencialmente similares a los de los experimentos IVA y las relaciones obtenidas a través de MSQuant se representaron de acuerdo con el molde identificador común IPI. Se seleccionaron después proteínas diana que mostraron al menos un 50% menos de unión a la concentración de competidor más alta de 100 μM en comparación con la reacción IVA control con perlas de ligando de alta densidad en ausencia de SB203580. Para estas dianas seleccionadas, las relaciones que representaban competición a SB203580 1 μM y 0,1 μM también se obtuvieron mediante MSQuant.

Los archivos de datos sin procesar resultantes de todos los experimentos con la resina inhibidora, por ejemplo, AX14596, se analizaron conjuntamente con el software MaxQuant (versión 1.0.12.0), que realiza la generación de listas de picos, cuantificación basada en SILAC, determinación de la tasa de descubrimientos falsos (FDR), ensamblaje de grupos de péptidos a proteínas y filtración de datos como se ha descrito (Graumann, J. y col. SILAC-labeling and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5111 proteins. *Mol Cell Proteomics* (2007); Cox, J. & Mann, M. Is proteomics the new genomics? *Cell* 130, 395-398 (2007)). Se buscaron datos por comparación con una versión directa e inversa concatenada de la base de datos IPI humana (versión 3.37) complementada con contaminantes frecuentemente detectados usando Mascot (Matrix Science, versión 2.1.04). La carbamidometilación de cisteína se estableció como una modificación fija y la proteína N-acetil y metionina oxidada se dejaron como modificaciones variables. Los espectros que se determinaron que resultaron de péptidos marcados pesados en la detección pre-búsqueda de componentes de SILAC por MaxQuant se buscaron con las modificaciones fijas Lys4, Lys8, Arg6 y Arg10, mientras que los espectros de EM/EM para los que no pudo asignarse estado de SILAC antes de la búsqueda en la base de datos se buscaron por comparación con Lys4, Lys8, Arg6 y Arg10 como modificaciones variables. La tolerancia de masa se fijó a 5 ppm para iones precursores monoisotópicos y a 0,5 Da para picos de EM/EM. La longitud de péptido mínima se fijó a 6 aminoácidos y se permitieron hasta tres escisiones ausentes y tres aminoácidos isotópicamente marcados por péptido. La tasa de descubrimientos falsos (FDR) aceptada fue del 1% para las proteínas y péptidos. El corte para la probabilidad de error posterior (PEP) de péptidos se estableció al 10%. La PEP de péptidos se determinó generando puntuación de Mascot e histogramas dependientes de la longitud del péptido para tanto los éxitos directos como inversos y luego derivando la probabilidad de una falsa identificación para un péptido de puntuación superior dada usando el teorema de Bayes. Entonces se multiplicaron las PEP de péptidos que pertenecen a las mismas proteínas. Cada secuencia de péptidos se consideró solo una vez con la menor PEP determinada en caso de secuenciación múltiple del mismo patrón isotópico o de especies de péptidos con diferentes SILAC, carga o estados de modificación. Las proteínas se clasificaron entonces según sus productos de sus PEP de péptidos y se incluyeron hasta que se alcanzó una FDR del 1% según la fracción de proteínas inversas contenidas en la lista de proteínas. Además del umbral de FDR aplicado a la identificación de proteínas, las proteínas solo se incluyeron cuando se identificaron con al menos dos péptidos (de los cuales uno se requirió por ser único para la proteína) y se cuantificaron si al menos un par de SILAC cuantificable se asoció a ellos. Los valores atípicos no se eliminaron ya que se calcularon las relaciones de proteína como la mediana en lugar del promedio de todas las relaciones de péptidos. Para péptidos compartidos entre diferentes proteínas identificadas, las relaciones de SILAC solo se consideraron para la relación de la proteína identificada con el mayor número de péptidos únicos. Las relaciones de proteína para los diferentes experimentos de asociación in vitro se corrigieron para la relación de reunión de SILAC inicial, que se determinó a partir de la mediana de relaciones de proteína en extractos de células codificadas por SILAC reunidas.

Las proteínas cuantificadas se clasificaron primero según la relación promediada de proteína unida a perlas de control sin inhibidor frente a proteína unida a perlas de inhibidor. Solo se consideraron adicionalmente proteínas con una relación de fondo inferior a 0,2. Posteriormente se tomaron proteínas para las que las relaciones de unión en la segunda ronda frente a la primera de incubación con perlas de inhibidor estuvieron disponibles como duplicados con sus valores promediados para la posterior evaluación de datos (en el caso de que este valor promediado fuera inferior a uno). Contaminantes probables que presentan una relación invertida en los experimentos por duplicado se excluyeron del posterior análisis. La relación r de unión de proteína diana en la segunda ronda frente a la primera de la asociación in vitro se usó para calcular las constantes de disociación respectivas K_i ($\text{Inhibidor}_{\text{Inmo}}$) para el inhibidor inmovilizado según la ecuación:

$$K_i (\text{Inhibidor}_{\text{Inmo}}) = [\text{Inhibidor}_{\text{Inmo}}] \times r / (1 - r)$$

$[\text{Inhibidor}_{\text{Inmo}}]$ fue la concentración de inhibidor inmovilizado en el volumen final del ensayo de unión. Además, se determinaron relaciones de dianas unidas a resina después de 5 h frente a 2,5 h y para la unión de 1 mg en comparación con 3 mg de extractos de partida para evaluar a qué grado se satisficieron las condiciones de unión en equilibrio en los experimentos de asociación in vitro.

En paralelo, las relaciones corregidas por error reunidas de los experimentos de competición usando una resina inhibidora, por ejemplo, AX14596, y diferentes concentraciones de inhibidor libre, por ejemplo, concentraciones de gefitinib, se usaron para determinar valores de CI_{50} para la inhibición al 50% de la unión para dianas, para las que estuvieron disponibles valores de K_d para ligando inmovilizado. Las relaciones correspondientes de experimentos por duplicado se promediaron.

Usando la ecuación para una saturación de sitio con la máxima unión en ausencia de inhibidor fijado al 100%, los valores de CI_{50} específicos para diana se determinaron con el módulo de unión a ligando de SigmaPlot (versión 10.0, software Systat, Inc.). Solo se consideraron proteínas diana con relaciones de 0,6 o menos a la mayor concentración de inhibidor libre en comparación con la incubación de control. Posteriormente se calcularon valores de K_i diana para inhibidores libres según la ecuación de Cheng-Prusoff:

$$K_i (\text{InhibidorLibre}) = K_i (\text{InhibidorInmo}) / ([\text{InhibidorInmo}] + K_i (\text{InhibidorInmo})) \times CI_{50} (\text{InhibidorLibre})$$

Ejemplo 9: Determinación de Constantes de Unión

Las relaciones obtenidas de los experimentos IVA1 e IVA2 se convirtieron a porcentajes de unión a diferentes densidades de ligando. Los valores de K_d se determinaron usando software SIGMA PLOT, módulo de Unión de Ligando usando ecuación para una saturación de sitio con unión máxima ajustada al 100%. El valor de K_d para dianas individuales calculado a partir de dos experimentos independientes generalmente estaba dentro de dos veces.

La prevención dependiente de dosis de la unión de las proteínas diana SB203580 al inhibidor inmovilizado medida por MS cuantitativa pudo representarse como curvas de dosis-respuesta. Los datos se ajustaron a ecuación de competición de un sitio usando SIGMAPLOT para determinar la IC_{50} específica de diana para SB203580. Posteriormente, los valores de IC_{50} para SB203580 y los valores de K_d determinados previamente para V16743 inmovilizada pudieron usarse para determinar los valores de K_d para dianas SB203580 representadas en la resina de afinidad V16742, de acuerdo con la fórmula:

$$K_d(\text{SB203580}) = (K_d(\text{V16742})/K_d(\text{V16742}) + [\text{V16742}]) \times IC_{50}(\text{SB203580})$$

Ejemplo 10: Ensayos de quinasa

Los ensayos de quinasa in vitro de proteína quinasa 2 de interacción con receptor (RIPK2), quinasa terminal de NH2 de c-jun $2\alpha 2$ (JNK $2\alpha 2$), caseína quinasa 1δ (CK 1δ), receptor de efrina B4 (EphB4) (todos de Upstate), caseína quinasa 1ϵ (CK 1ϵ) (Invitrogen), glucógeno sintasa quinasa 3β (GSK 3β), quinasa de tumor de mama (BRK), las quinasas Lyn y Yes de la familia Src, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos (Met) (todos de ProKinase) y quinasa asociada a ciclina G (GAK) (Godl, K. y col. An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 15434-15439 (2003)) se realizaron en tampón quinasa que contenía HEPES-NaOH 60 mM, pH 7,5, MgCl $_2$ 3 mM, MnCl $_2$ 3 mM, ortovanadato de sodio 3 μ M y ditioneitol 1,2 mM. Como sustratos sirvieron 0,33 mg/ml de proteína básica de mielina (Sigma Aldrich) para RIPK2 y BRK, 200 μ mol/l de CK1tida (Upstate) para CK 1δ y CK 1ϵ , 0,2 mg/ml de mezcla de histonas (Roche) para GAK, 0,2 mg/ml de poli (Glu4Tyr) (Sigma) para EphB4, Lyn, Yes y Met, 80 μ g/ml de GST-c-jun (Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A. & Karin, M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. Genes Dev 7, 2135-2148 (1993)) para JNK $2\alpha 2$ y sustrato GSK 3β 50 μ M (Calbiochem) para GSK 3β . Todas las quinasas se ensayaron en un volumen total de 25 μ l en presencia de ATP 0,1 μ M, 0,5 μ Ci de [γ -33P]ATP y diferentes concentraciones de SB203580 o gefitinib. Tras una etapa de pre-incubación de 30 min sobre hielo, las reacciones de quinasa se empezaron mediante la adición de ATP y se realizaron durante 7 min a 30 °C. Las reacciones de quinasa fueron lineales durante el tiempo de incubación. En el caso de GAK y RIPK2, la reacción se detuvo mediante la adición de 3x tampón de muestra SDS. Después de la electroforesis en gel, las proteínas de sustrato fosforiladas se cuantificaron por detección y cuantificación de la radiactividad. Para todas las otras quinasas, las reacciones se terminaron mediante la adición de 6 μ l de ácido fosfórico al 3% y sustratos fosforilados se unieron a filtros de fibra de vidrio P30 (Wallac, Turku, Finlandia) para medir la incorporación de 33P. Para ensayos de quinasa in vitro de EGFR, células HeLa S3 se cultivaron a confluencia sobre placas de 15 cm en DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal (Invitrogen). Los lisados se prepararon con 750 μ l de tampón de lisis y se aclararon previamente por centrifugación (Blencke, S., Ullrich, A. & Daub, H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. J Biol Chem 278, 15435-15440 (2003)). Se inmunoprecipitaron alícuotas de 350 μ l de lisado con anticuerpo mAb108.1 y perlas de proteína G-Sepharose durante 3 h a 4 °C (Blencke, S., Ullrich, A. & Daub, H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. J Biol Chem 278, 15435-15440 (2003)). Las perlas se lavaron dos veces con 300 μ l de tampón de lisis sin aditivos y dos veces con 200 μ l de tampón quinasa. Los EGFR precipitados se pre-incubaron entonces

sobre hielo durante 30 min en tampón quinasa complementado con 0,2 mg/ml de poli (Glu4Tyr) y diferentes concentraciones de gefitinib. Las reacciones de quinasa se empezaron mediante la adición de ATP 0,1 μ M y 1 μ Ci de [γ -³³P]ATP y se realizaron durante 10 min a 30 °C en un volumen total de 50 μ l antes de la adición de 12 μ l de ácido fosfórico al 3% y midiendo la incorporación de ³³P en sustrato unido a filtro. Para todas las quinasas, los valores de CI50 se determinaron entonces usando SigmaPlot (versión 10.0, software Systat, Inc.). CI50 $\cong$ Ki para las quinasas analizadas, ya que la concentración de ATP usada en todos los ensayos (0,1 μ M) fue considerablemente inferior a los valores de KM para ATP (Knight, Z.A. & Shokat, K.M. Features of selective kinase inhibitors. Chem Biol 12, 621-637 (2005)).

10

Tabla 1

Nº de Acceso	Nombre de la Quinasa	EXPERIMENTO 1 <u>Porcentaje unido a diversas concentraciones de 16742</u>					EXPERIMENTO 2 <u>Porcentaje unido a diversas concentraciones de 16742</u>									
		52 μ M	8,74 μ M	1,87 μ M	Kd (μ M)	R2	52 μ M	8,74 μ M	1,87 μ M	Kd (μ M)	R2				Media de Kd (μ M)	Desv. Media
IPI00298940.3	AurA	95,30	105,34	82,56	0,33	0,60	95,21	87,69	85,71	0,38	0,00	0,36	0,02			
IPI00219129.8		96,92	108,34	80,25	0,37	0,57	98,51	89,23	72,33	0,75	0,97	0,56	0,19			
IPI00479760.3	AAK1	87,47	86,28	70,74	0,87	0,16	91,12	78,23	71,67	0,95	0,00	0,91	0,04			
IPI00397883.5		89,78	91,84	72,25	0,74	0,66	94,35	74,89	68,93	1,11	0,31	0,93	0,18			
IPI00410344.2	PLK4	95,46	NA	NA	NA	NA	97,42	82,19	67,92	1,01	0,85	1,01	0,00			
IPI00220305.1	JNK1	93,86	90,77	64,94	1,01	0,96	96,58	80,37	66,69	1,10	0,81	1,05	0,05			
IPI00176642.3	AurB	92,00	102,64	63,29	0,90	0,76	92,69	73,95	62,51	1,46	0,57	1,18	0,28			

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

		MAP/reguladora de afinidad de microtúbulos																		
IP100028570.2	GSK3B	Isoforma 1 de Glucógeno quinasa 3 beta	91,30 51,81	12,33	8,44	0,98	88,20	41,97	8,04	11,58	0,98	10,01	1,57							
IP100293613.2	TBK1	Proteína serina/treonina quinasa TBK1	93,66	10,70	7,36	0,96	89,79	35,10	4,18	13,68	0,95	10,52	3,16							
IP100011633.3	JAK1	Proteína tirosina quinasa JAK1	90,34	16,10	4,76	0,91	78,69	30,74	8,59	17,38	0,99	11,07	6,31							
IP100216433.2	LIMK1	Isoforma 2 de quinasa 1 de dominio LIM	85,65	14,59	10,35	1,00	84,74	39,93	12,62	12,13	0,99	11,24	0,89							
IP100021917.1	RIPK2	Isoforma 1 de Proteína serina/treonina quinasa 2 de interacción con receptor	91,89	3,74	11,44	0,95	90,30	38,79	5,20	12,44	0,96	11,94	0,50							
IP100027729.1	CK1e	Isoforma Epsilon de caseína quinasa I	34,02	6,91	16,10	0,99	88,21	37,16	7,41	12,98	0,97	14,54	1,56							
IP100008471.3	MELK	Quinasa de cremallera de leucina embrionica materna	83,76	6,96	13,78	0,98	92,09	25,25	8,41	15,57	0,91	14,68	0,90							
IP100012443.1		Isoforma Larga de proteína de unión intercelular a factor de	66,36	14,25	19,19	0,93	79,33	45,38	15,03	11,15	0,99	15,17	4,02							

		crecimiento de fibroblastos ácido																	
IPI00465142.2		Proteína hipotética	64,07	38,13	16,29	18,41	0,84	80,85	38,28	17,40	12,72	0,99		15,58	2,85				
IPI00745793.1		Ciclina específica de G2/mitosis B1	70,32	33,18	14,34	18,49	0,98	77,64	38,93	10,64	14,29	1,00		16,39	2,10				
IPI00420065.2		Acll CcA deshidrogenasa putativa	94,11	21,24	7,63	16,41	0,88	96,73	NA	NA	NA	NA		16,41	0,00				
IPI00292228.1	GSK3A	Glucógeno sintasa quinasa 3 alfa	84,48	35,37	7,34	14,32	0,98	78,29	29,09	4,30	18,83	0,98		16,58	2,26				
IPI00555838.1	MARK2	Isoforma 1 de proteína serina/treonina quinasa MARK2	75,75	45,68	5,47	12,64	0,96	78,93	24,33	5,83	20,74	0,97		16,69	4,05				
IPI00152303.5		Fosfatidilinositol 4 fosfato 5 quinasa, tipo II, gamma	79,18	48,71	8,85	11,11	0,97	70,31	25,42	4,70	24,03	0,99		17,57	6,46				
IPI00022353.4	TYK2	Proteína tirosina quinasa no receptora TYK2	90,40	34,27	10,20	13,00	0,96	01,07	16,35	4,00	22,05	0,92		17,93	4,92				
IP100158248.1	MAP2K5	Isoforma A de proteína quinasa quinasa 5 activada por mitógeno	72,51	26,45	10,27	21,43	0,99	82,04	31,43	16,86	14,87	0,97		18,15	3,28				
IPI00448798.4	CK1a	Caseína quinasa 1, isoforma 1 alfa 1	60,94	31,78	6,51	20,77	0,95	83,66	34,46	5,11	16,85	0,98		18,81	1,96				
IPI00293652.1	IRAK1	Isoforma 1 dc quinasa 1	86,24	19,01	6,84	19,54	0,91	92,34	17,85	5,21	18,25	0,87		18,00	0,64				

		asociada a receptor de interleuquina 1																
IPI00025698.2	LIMK2	Isoforma 1 de quinasa 2 de dominio LIM	77,17	26,61	7,76	19,75		0,98	25,37	9,42	18,54	0,97	19,14	0,60				
IPI00220842.8		14 3 3 proteína gamma	66,26	29,65	15,84	22,03	0,94	70,62	36,47	16,87	16,38	0,95	19,21	2,83				
IPI0013890.1		14 3 3 proteína sigma	64,68	26,55	16,70	24,62	0,92	75,16	39,83	13,01	14,23	0,99	19,43	5,19				
IPI00219510.1	KHS2	Isoforma 3 de proteína quinasa 3 activada por mitógeno	80,83	21,37	11,86	19,86	0,94	73,60	NA	NA	NA	NA	19,86	0,00				
IPI00013905.1		Subunidad beta 2 de proteína quinasa activada por 5' AMP	75,10	35,62	28,74	13,18	0,76	66,35	22,25	3,76	28,36	1,00	20,77	7,59				
IPI00151170.4	TTK	Proteína quinasa	78,07	25,50	6,43	20,06	0,98	74,84	24,47	5,99	21,97	0,98	21,02	0,95				
IPI00465101.5	NEK3	CDNA FLJ18392 moderadamente similar a proteína serina/treonina de Mus musculus	80,27	19,21	6,25	21,60	0,94	87,40	NA	NA	NA	NA	21,80	0,00				
IPI00220409.2		Subunidad beta 1 de proteína quinasa activada por 5' AMP	76,30	31,58	9,48	17,72	1,00	71,37	19,16	3,94	26,69	0,97	22,20	4,48				
IPI00749256.1	FAK	Variante de la isoforma b de PTK2 proteína tirosina	66,44	13,68	4,90	23,58	0,96	84,20	23,10	14,24	21,37	0,93	22,47	1,10				

IPI00168907.1		quinasa 2 (Fragmento)	76,48	25,73	5,87	20,70	0,98	79,14	15,02	5,03	24,25	0,92	22,48	1,78
IPI00000878.3	TEC	Inositol polifosfato multiquinasa Proteína tirosina quinasa Tec	68,89	24,83	5,66	24,99	1,00	79,09	24,01	6,19	20,31	0,97	22,65	2,34
IPI00015809.1		Probable Q sialoglicoproteína endopeptidasa	83,80	14,76	8,48	21,82	0,89	82,06	10,99	5,68	24,48	0,88	23,15	1,33
IPI00307755.3	AMPKa1	Subunidad catalítica alfa 2 de proteína quinasa activada por 5' AMP	73,97	24,30	6,68	20,25	0,99	69,44	20,73	4,41	27,00	0,99	23,63	3,37
IPI00012318.3	MAP3K1	PREDICHA: proteína quinasa quinasa quinasa 1 activada por mitógeno	71,88	24,16	6,46	23,50	0,99	73,42	22,44	4,91	23,78	0,98	23,64	0,14
IPI00016813.2	CK2a1	Proteína CSNK2A1	74,51	27,35	3,69	21,19	0,99	69,82	21,81	1,98	26,62	0,98	23,90	2,71
IPI004113318.3		Altamente similar a PROTEÍNA QUINASA ACTIVADA POR 5' AMP, SUBUNIDAD GAMMA 1	72,68	28,05	5,77	21,36	1,00	67,52	23,82	5,08	26,58	1,00	23,97	2,81
IPI00000818.1		14 3 3 proteína épsilon	68,65	28,18	17,01	21,29	0,94	84,48	24,78	11,54	26,80	0,98	24,05	2,75
IPI00479349.1	SGK	OTTHUMP00000017246	69,99	24,06	9,34	24,09	0,99	71,42	NA	NA	NA	NA	24,09	0,00
IPI00296949.1	GAK	Quinasa asociada a	69,07	29,77	8,35	21,85	1,00	63,94	27,34	6,15	26,72	0,99	24,28	2,43

[illegible]

IPI00001477.1		tirosina quinasa 2 beta	64,85	23,82	3,72	28,57	1,00	65,72	10,81	5,18	35,11	0,95			
IPI00440727.1	DDR1		73,70	6,55	0,33	32,00	0,88	81,49	NA	NA	NA	NA	32,00	0,00	
	BRD4	Isoforma 1 de proteina 4 que contiene Bromodominio													
IPI00002538.1	PDK1	Isoforma 1 de proteina quinasa 1 dependiente de 3 fosfoinositido	68,49	15,74	4,14	30,34	0,97	66,40	12,63	3,00	33,88	0,96	32,11	1,77	
IPI00017305.2	RSK3	Quinasa alfa 1 de proteina Ribosomal S6	73,55	6,46	1,85	31,91	0,88	73,35	5,37	1,68	32,62	0,88	32,27	0,35	
IPI00014266.1	BRD3	Isoforma 1 de proteina 3 que contiene Bromodominio	71,55	0,00	0,00	36,95	0,84	65,82	11,86	8,24	33,89	0,95	35,42	1,53	
IPI00413780.3	PKN3	Proteina serina/treonina quinasa N3	65,30	14,08	4,34	33,73	0,97	63,27	9,07	4,03	38,62	0,94	36,17	2,44	
IPI00021275.4	EphB2	Isoforma 1 del precursor del receptor 2 de Efrina tipo B	66,97	17,01	4,79	30,65	0,98	57,74	13,05	2,86	42,27	0,99	36,46	5,81	
IPI00013981.3	YES	Proteina tirosina quinasa Yes de protooncogen	62,69	25,17	4,07	29,34	0,99	54,74	15,31	3,61	44,27	1,00	36,81	7,48	
IPI00003479.2	Erk2	Proteina quinasa 1 activada por mitogeno	70,05	5,40	1,41	35,12	0,89	65,58	5,90	2,43	38,55	0,91	36,83	1,72	

IP100742671.1	MAST2	Serina/treonina quinasa 2 asociada a microtúbulo	49,33	23,19	6,16	45,23	0,93	66,42	8,58	4,53	35,89	0,93	40,56	4,67
IP100028932.7	MAST3	Proteína serina/treonina quinasa 3 asociada a microtúbulo	63,78	9,80	3,18	37,83	0,95	58,06	10,45	1,81	43,85	0,97	40,84	3,01
IP100216470.1		Isoforma 1 de fosfatidilinositol 4 fosfato 5 quinasa tipo 2 beta	58,23	17,93	4,91	37,98	1,00	55,61	11,02	2,91	46,35	0,98	42,17	4,18
IP100029488.1		Isoforma A de Cetohecoquinasa	60,80	65,73	2,62	45,99	0,89	65,56	4,09	2,80	39,56	0,89	42,77	3,22
IP100470811.3	SNRK	Isoforma 1 de Proteína serina/treonina quinasa relacionada con SNF	55,13	58,22	5,63	41,36	0,97	58,09	8,91	2,86	44,68	0,98	43,01	1,65
IP100011488.3	MST1	Proteína serina/treonina quinasa 4	66,66	6,04	4,63	37,11	0,90	57,75	2,89	1,84	49,39	0,91	43,25	6,14
IP100014068.1	PAK4	Isoforma 1 de proteína Serina/treonina quinasa PAK 4	58,35	12,12	2,84	42,17	0,98	57,23	10,45	2,51	44,73	0,97	43,45	1,28
IP100289342.1	EphB4	Precursor del receptor 4 de efrina tipo B	61,05	18,14	3,95	35,16	1,00	50,80	12,85	2,71	52,10	1,00	43,63	8,47
IP100009688.1		Fosfatidilinositol 4 fosfato 5 quinasa tipo 2 alfa	62,04	16,91	4,38	34,92	0,99	49,22	15,42	3,81	52,38	1,00	43,65	8,73

IPI00291215.4		Linfoma 2B de alto grado de malignidad B	57,30	15,01	2,90	41,43	0,99	50,54	11,10	2,48	53,98	0,99	47,70	6,27
IPI00296992.6	AXL	Isoforma 1 de tirosina quinasa de receptor AXL	60,74	8,51	3,58	41,69	0,95	50,79	6,87	2,59	56,92	0,96	49,31	7,62
IPI00020454.1		Desoxicitidina quinasa	52,00	3,09	0,41	58,30	0,92	64,81	3,24	1,56	41,00	0,89	49,65	8,65
IPI00000685.1	CDK7	Proteína quinasa 7 de división celular	53,96	22,04	5,76	39,85	0,98	45,57	13,18	2,34	61,48	1,00	50,67	10,82
IPI00017083.4	CaMKK1	Isoforma 1 de proteína quinasa 1 dependiente de Calcio/calmodulina	63,34	10,67	2,08	37,92	0,95	47,32	6,65	1,46	63,90	0,97	50,91	12,99
IPI00306406.3	RIOK2	Proteína serina/treonina quinasa RIO2	58,06	11,61	4,37	42,57	0,98	48,34	7,91	1,55	60,79	0,98	51,68	9,11
IPI00013467.4	BUB1	Proteína serina/treonina quinasa BUB1 de punto de control mitótico	50,46	11,95	2,48	53,44	0,99	47,87	NA	NA	NA	NA	53,44	0,00
IPI00074258.3	MASTL	Isoforma 1 de tipo proteína serina/treonina quinasa asociada a microtúbulos	51,63	9,59	0,55	53,79	0,98	62,29	NA	NA	NA	NA	53,79	0,00
IPI00513903.3	MAP3K2	Proteína quinasa quinasa 2 activada por	49,07	14,72	4,06	53,15	1,00	48,40	14,47	3,52	54,66	1,00	53,91	0,75

		mitógeno																		
IPI00017726.1		Hidroxiacil coenzima A deshidrogenasa, tipo II isoforma 1		62,08	4,37	4,41	42,68	0,90	41,03	10,79	8,75	72,75	0,94	57,72		15,03				
IPI00021267.1	EphA2	Precursor de receptor 2 de efrina tipo A		54,66	13,88	3,91	45,35	1,00	43,73	7,66	2,12	70,80	0,99	58,08		12,72				
IPI00747469.1	PITSLRE	Proteína de 92 kDa		49,06	12,03	1,13	56,07	0,99	46,71	4,78	2,00	66,72	0,96	61,40		5,33				
IPI00337659.1	TLK2	Isoforma 2 de proteína serina/treonina quinasa de tipo tousel 2		58,72	3,89	2,49	47,33	0,91	41,78	3,73	1,24	79,97	0,96	63,65		16,32				
IPI00018195.1	Erk1	Proteína quinasa 3 activada por mitógeno		52,52	2,41	1,06	57,60	0,92	45,83	2,38	0,91	71,10	0,93	64,45		6,65				
IPI00018873.1		Isoforma 1 de nicotinamida fosforibosiltransferasa		54,03	2,70	2,80	54,76	0,91	41,68	3,40	2,28	80,33	0,95	67,54		12,78				
IPI00339361.5	TLK1	Isoforma 1 de proteína serina/treonina quinasa de tipo tousel 1		49,12	2,39	1,34	63,98	0,92	31,56	1,97	0,76	120,90	0,96	92,44		28,46				
IPI00219250.1	DYRK1A	Isoforma 1 de tirosina quinasa 1A regulada por fosforilación con especificidad Dual		52,16	14,82	5,75	47,78	1,00	28,11	3,76	1,08	137,32	0,99	92,55		44,77				

IP100017469.1			51,84	2,59	2,16	58,59	0,92	30,43	1,52	1,04	127,45	0,95	93,02	34,43
IP100006372.3			51,05	2,55	2,22	60,01	0,92	24,69	1,91	2,11	165,29	0,97	112,65	52,64
IP100221141.2	p38a		49,78	6,72	4,98	58,33	0,96	24,52	1,43	3,02	167,25	0,95	112,79	54,46
IP100012891.1	PHKg2		59,42	NA	NA	NA	NA	27,11	2,29	1,94	146,21	0,97	146,21	0,00
IP100479216.1	MAP3K5		56,90	10,05	7,42	44,47	0,96	17,64	1,00	1,27	251,55	0,97	148,01	103,54
IP100416221.2	MAP3K6		51,68	3,57	4,37	57,65	0,93	13,37	3,94	2,67	325,95	0,91	191,80	134,15
Pie de tabla :														
NA implica que el acierto proteico no pudo identificarse en la composición IVA1 ni IVA2 de ese experimento y por lo tanto no se asignaron valores. El valor R ² es una medida de bondad de ajuste de la curva mientras que los datos se ajustan para deducir los valores Kd. La media de Kd es la media de valores Kd obtenidos de dos experimentos o el valor sencillo Kd si se obtiene de sólo uno de los experimentos.														

Tabla 2

			PORCENTAJE UNIDO EN PRESENCIA DE SB203580							
Número IPI	Nombre de la quinasa	Descripción	0,1 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	Ki(M)	R2	Kd(μ M)	CE50
IPI00021917.1	RIPK2	Isoforma 1 de proteína serina/treonina quinasa 2 que interactúa con Receptor	37,17	8,75	1,83	1,74	0,01	0,98	11,94	0,06
IPI00234463.4	CK1d	Isoforma 1 de Caseína quinasa I isoforma delta	107,15	28,21	7,11	0,00	0,08	0,92	6,23	0,63
IPI00298949.1	GAK	Quinasa asociada a ciclina G	107,77	34,13	6,62	2,61	0,26	0,94	24,28	0,74
IPI00027729.1	CK1e	Caseína quinasa I isoforma épsilon	116,64	44,73	22,07	3,06	0,30	0,89	14,54	1,26
IPI00024673.2	JNK2	Isoforma Alfa 2 de proteína quinasa 9 activada por Mitógeno	90,73	94,06	47,75	12,38	0,27	0,98	1,30	9,85
IPI00448798.4	CK1a	Caseína quinasa 1, alpha 1 isoforma 1	141,81	85,08	44,18	6,68	2,33	0,81	18,81	8,03
IPI00216190.1	GSK3B	Isoforma 1 de Glucógeno sintasa quinasa 3 beta	105,84	115,61	51,89	14,41	2,52	0,91	10,01	14,16

IPI00018195.1	Erk1	Proteína quinasa 3 activado por mitógeno	110,13	93,40	86,38	48,19	51,14	0,93	64,45	87,76
IPI00017469.1	0	Sepiapterina reductasa	109,59	62,47	95,01	32,00	36,50	0,59	93,02	54,61

Tabla 3

Análisis proteómico cuantitativo de dianas celulares de gefitinib

PK ^a	r(% UNIDO) ^b	K _d (AX14596) ^c [mM]	IC ₅₀ (GEF. ^f) [mM]	K _i (GEF. ^f) [mM]	IC ₅₀ (GEF.) ^d [mM]
RIPK2	0.06 (94%)	6.2	3.8	0.22	0.046
EGFR	0.31 (69%)	44	0.51	0.16	0.005
BRK	0.31 (69%)	45	2.8	0.86	0.28
GAK	0.45 (55%)	82	0.10	0.046	0.035
JNK2	0.52 (48%)	110	2.1	1.1	6.0
LYN	0.66 (34%)	195	3.2	2.1	0.41
EphB4	0.71 (29%)	242	1.4	0.96	0.42
MET	0.73 (27 %)	267	1.7	1.2	5.5
YES	0.87 (13%)	658	9.4	8.1	1.3

Tabla 4

EXPT	DETERMINACIÓN	INHIBIDOR INMOVILIZADO [μM]	ETIQUETAS	RATIOS
1	DETERMINACIÓN DE K _i AX14596- ESQUEMA DE ETIQUETADO RECÍPROCO	100.1	L: 2º ELUATO DE PERLAS AX14596 M: ELUATO DE PERLAS CONTROL H: 1º ELUATO DE PERLAS AX14596	R ₂ (2. INC/1. INC) - L/H NORMALIZADO 1 R ₂ (CONTROL/1. INC) - M/H NORMALIZADO 1
2	DETERMINACIÓN DE K _i AX14596 - ESQUEMA DE ETIQUETADO NORMAÑ	100.1	L: 1º ELUATO DE PERLAS AX14596 M: ELUATO DE PERLAS CONTROL H: 2º ELUATO DE PERLAS AX14596	R ₂ (2. INC/1. INC) - H/L NORMALIZADO 2 R ₂ (CONTROL/1. INC) - M/L NORMALIZADO 2
3	DETERMINACIÓN DE K _i AX14596 - CONCENTRACIÓN DE LIGANDO CONTROL	100.1	L: INCUBACIÓN DE 3 MG DE PROTEÍNA CON PERLAS AX14596; H: INCUBACIÓN DE 1 MG DE PROTEÍNA CON PERLAS AX14596	R(3 MG/1 MG LISADO) - L/H NORMALIZADO 3
4	DETERMINACIÓN DE K _i AX14596 - TIEMPO DE INCUBACIÓN CONTROL	100.1	L: 5 H TIEMPO DE INCUBACIÓN H: 2.5 H TIEMPO DE INCUBACIÓN	R(5 H/2.5 H INC. TIEMPO) - L/H NORMALIZADO 4
5	DETERMINACIÓN DE IC ₅₀ DE GEFITINIB-0, 0.01, 0.1 μM - EXPERIMENTO 1	100.1	L: COMPETICIÓN CON 0 nM AX14596 M: COMPETICIÓN CON 1000 nM AX14596 H: COMPETICIÓN CON 10000 nM AX14596	R ₂ (10 nM/0 nM GEF.) - M/L NORMALIZADO 5 R ₂ (100 nM/0 nM GEF.) - H/L NORMALIZADO 5

(continuación)

EXPT	DESCRIPCIÓN	INHIBIDOR INMOVILIZADO [mM]	ETIQUETAS	RATIOS
6	DETERMINACIÓN DE IC_{50} DE GEFITINIB - 0, 1, 10 μ M - EXPERIMENTO 1	100.1	L: COMPETICIÓN CON 0 nM AX14596 M: COMPETICIÓN CON 1000 nM AX14596 H: COMPETICIÓN CON 10000 nM AX14596	R_1 (1000 nM/0 nM GEF.) = M/L NORMALIZADO 6 R_L (10000 nM/0 nM GEF.) = H/L NORMALIZADO 6
7	DETERMINACIÓN DE IC_{50} DE GEFITINIB-0, 0.01, 0.1 μ M - EXPERIMENTO 2	100.1	L: COMPETICIÓN CON 0 nM AX14596 M: COMPETICIÓN CON 10 nM AX14596 H: COMPETICIÓN CON 100 nM AX14596	R_2 (10 nM/0 nM GEF.) = M/L NORMALIZADO 7 R_3 (100 nM/0 nM GEF.) = H/L NORMALIZADO 7
8	DETERMINACIÓN DE IC_{50} DE GEFITINIB - 0, 1, 10 μ M - EXPERIMENTO 2	100.1	L: COMPETICIÓN CON 0 nM AX14596 M: COMPETICIÓN CON 1000 nM AX14596 H: COMPETICIÓN CON 10000 nM AX14596	R_3 (1000 nM/0 nM GEF.) = M/L NORMALIZADO 8 R_3 (10000 nM/0 nM GEF.) = H/L NORMALIZADO 8

Tabla 5

Proteína líder	PK	Nombre del gen	Γ_{promedio} (2 INC/ 1 INC)	K_i (V116742) [μM]	Γ_{promedio} (CTRL/ 1 INC)	Γ (3 MG/ 1 MG LYSATE)	Γ (5 h/ 2.5 h TIEMPO INC.)	Γ_{promedio} (100 nM /0 nM SB)	Γ_{promedio} (1000 nM /0 nM SB)	Γ_{promedio} (10000 nM /0 nM SB)	Γ_{promedio} (100000 nM/ 0 nM SB)	IC_{50} , promedio (SB2035 80) [nM]	K_i promedio [nM] (SB2035 80)	$\text{IC}_{50} \sim K_i$ [nM], Ensayo Quinasa (SB2035 80)
IPI00172460	CaMK2g	CAMK2G	0.03	1.60	0.06	2.80	0.88	0.83	1.02	0.83	0.95			
IPI00828081	CaMK2d	CAMK2D	0.04	1.80	0.02		0.82	0.82	1.10	0.86	1.01			
IPI00301809	NEK9	NEK9	0.04	2.30	0.02	2.81	0.82	0.84	1.07	0.91	0.98			
IPI00215786		PDE10A	0.05	2.58	0.03		0.88	0.74	0.87	0.75	0.91			
IPI00220305	JNK1	MAPK8	0.05	3.01	0.04	3.21	0.84	0.81	1.00	0.82	0.51	93140	4505.40	
IPI00288840	AurA	AURKA	0.06	3.23	0.03	3.71	1.16	0.84	0.83	0.82	0.85			
IPI00024873	JNK2	MAPK9	0.06	3.43	0.05	3.19	0.81	0.87	0.82	0.64	0.13	16760	918.88	727.55
IPI00411818	ULK3	ULK3	0.06	3.48	0.03	1.52	0.85	0.85	1.02	0.97	0.85			
IPI00420065		ACAD11	0.06	3.50	0.05	3.26	1.01	1.01	0.89	1.01	0.93			
IPI00008835	PKD2	PRKD2	0.06	3.56	0.02	3.08	1.11	0.90	0.89	0.85	0.35	54930	3117.67	
IPI003034648	caMLCK	MYLK3	0.07	3.68	0.01		0.91	1.02	1.00	1.03	0.56	140700	8200.91	
IPI00031881	CDK2	CDK2	0.07	3.69	0.04	2.83	0.87	1.00	1.08	0.85	0.96			

IP000293813	TBK1	TBK1	0.07	3.74	0.03	3.37	1.00	0.95	1.11	0.98	1.03			
IP00023630	CDK5	CDK5	0.07	3.75	0.03	2.52	0.96	0.83	1.01	0.80	0.95			
IP00014934	DRAK2	STK17B	0.07	3.75	0.01	4.20	0.79	0.95	1.05	0.75	0.81			
IP00052681	TNK1	TNK1	0.07	3.81	0.02	3.16	1.01	1.05	0.98	0.98	0.74			
IP00015538	PKD3	PRKD3	0.07	4.01	0.05	2.91	1.02	1.00	1.03	0.97	0.46	93530	5933.54	
IP00028643	ZAK	MLTK	0.07	4.07	0.08	3.74	0.89	0.77	1.14	0.81	0.79			
IP000219129		NOO2	0.07	4.13	0.14	2.88	0.91	0.88	1.02	0.84	0.82			
IP00013004		PDXK	0.08	4.55	0.06	2.97	0.96	0.89	1.06	0.86	0.86			
IP00021917	RIPK2	RIPK2	0.09	5.06	0.02	3.62	1.04	0.09	0.03	0.04	0.02	10.5	0.83	2.16
IP000216190	GSK3B	GSK3B	0.09	5.21	0.02	3.57	0.97	0.86	0.93	0.80	0.12	14340	1181.78	3117
IP000784013	JAK1	JAK1	0.09	5.35	0.04	3.65	0.98	0.89	0.90	0.78	0.36	47640	3952.36	
IP00022353	TYK2	TYK2	0.10	5.77	0.06	4.59	0.73	0.93	0.99	0.89	0.34	56630	5036.01	
IP000549658	PCTAIRE 1	PCTK1	0.10	5.99	0.02	2.88	0.89	0.81	1.07	0.82	0.99			
IP00030313		CCNT2	0.11	6.11	0.10			0.86	1.05	0.85	0.83			
IP00028263	FER	FER	0.11	6.26	0.05	2.83	0.98	0.85	1.01	0.92	0.84			
IP00028071	CLK2	CLK2	0.11	6.31	0.01		0.86	0.93	1.06	1.04	0.95			

IP000328638	ZAK	MLTK	0.11	6.34	0.04	3.14	0.93	0.90	1.08	0.88	0.80		
IP00165249	PPTAIRE1	PPTK1	0.11	6.52	0.01	2.59		0.89	0.81	0.90	0.85		
IP00020602	CK2a2	CSNK2 A2	0.11	6.59	0.04	2.69	0.91	1.01	1.04	0.94	0.93		
IP00376655	PCTAIRE 2	PCTK2	0.12	6.79	0.02	2.61	0.97	0.85	0.89	0.84	0.99		
IP00011416		ECH1	0.12	7.17	0.07	3.14	0.96	0.88	1.04	0.90	0.84		
IP00479760	AAK1	AAK1	0.12	7.18	0.03	3.58	1.13	0.88	1.00	0.86	0.92		
IP00306633	MPSK1	STK16	0.13	7.45	0.11	2.40	0.86	0.95	0.99	0.94	0.88		
IP00156037	MARK1	MARK1	0.13	7.45	0.07		0.95	0.93	1.03	0.87	0.90		
IP00552413	CDK9	CDK9	0.13	7.48	0.02	2.77	1.00	1.01	0.98	1.03	0.92		
IP00220508	MARK3	MARK3	0.13	7.71	0.04	3.35	1.04	0.92	0.99	0.91	0.90		
IP00234463	CK1d	CSNK1 D	0.13	7.74	0.02	3.10	1.00	0.94	0.99	0.15	0.02	150.9	150.9
IP00397883			0.13	7.92	0.03	3.51	1.01	0.80	0.85	0.76	0.96		
IP00008255		AZ12	0.14	8.57	0.12	2.83	1.01	0.99	1.07	0.90	0.94		
IP00176642	AurB	AURKB	0.14	8.59	0.02	3.77	1.20	0.99	1.05	1.04	0.84		
IP00006471	MELK	MELK	0.14	8.73	0.05		0.93	0.89	0.97	0.90	0.80		
IP00030247		CCNT1	0.15	9.22	0.08	2.91	1.00	1.03	1.06	0.98	0.98		

IP100337426	BIKE	BMP2K	0.16	9.92	0.04	2.88	0.85	0.88	1.00	0.84	0.91		
IP100639841		PEC1	0.17	10.36	0.03	3.20	0.86	0.85	1.03	0.89	0.84		
IP100022872	LIMK2	LIMK2	0.17	10.85	0.04		1.08	0.88	1.14	0.88	1.04		
IP100283652	IRAK1	IRAK1	0.17	10.90	0.06					1.23	1.37		
IP100800388		CSNK2 B	0.17	10.90	0.06	2.81	0.83	0.91	1.00	0.90	0.91		
IP100281702	LIMK1	LIMK1	0.17	10.96	0.06		1.45	0.86	1.55	0.99	0.93		
IP100648659	DRAK1	STK17A	0.18	11.75	0.03			0.98	0.89	0.93	0.78		
IP100022865		CCNA2	0.18	11.80	0.07	3.48	1.10	0.87	0.85	0.87	0.87		
IP100414292	PCTAIRE 3	PCTK3	0.19	12.47	0.05			0.76	0.81	0.80	0.85		
IP100282228	GSK3A	GSK3A	0.18	12.54	0.01	2.82	1.07	0.96	1.02	0.83	0.24	37870	6626.13
IP100787268			0.20	12.68	0.08	3.20	1.27	0.92	1.07	0.78	0.93	m	
IP100027683		CDA	0.20	12.70	0.06		1.02	0.98	0.89	0.98	0.84		
IP100288357	ULK1	ULK1	0.20	13.00	0.10	2.68	0.91	0.85	0.88	0.85	0.86		
IP100792479			0.20	13.23	0.04	3.10	1.19	0.91	1.00	0.92	0.94		
IP100022536	MSK2	RPS6KA 4	0.21	14.01	0.03	2.83	1.01	0.87	0.75	0.93	0.70		
IP100016809		OSGEP	0.21	14.04	0.08	7.41	0.99	0.84	1.36	0.91	1.20		
IP100027729	CK1e	CSNK1 E	0.21	14.18	0.03	3.31		1.03	0.77	0.25	0.03	3356	648.80
													415.05

IP100465101	NEK3	NEK3	0.22	14.35	0.05			0.99	0.93	0.92	0.91	0.88		
IP100152303		PIP4K2 C	0.23	15.26	0.04	3.21		0.88	0.89	1.04	0.91	0.87		
IP100465346	Sgk496	RIPK5	0.23	15.78	0.05				0.85	1.08	0.97	0.85		
IP100005858	LATS1	LATS1	0.24	16.57	0.09									
IP100217024	KHS2	MAP4K3	0.24	16.61	0.04	3.24		1.76	1.07	1.17	1.07	0.78		
IP100555838	MARK2	MARK2	0.25	17.00	0.04	2.90		1.03	0.93	0.94	0.96	0.92		
IP100640857	MRCka	CDC42B PA	0.25	17.25	0.07									
IP100185880	MAP2K5	MAP2K5	0.25	17.62	0.03			0.90	0.91	0.99	0.87	0.85		
IP100655852	SGK3	SGK3	0.25	17.65	0.03									
IP100410287	AMPKa1	PRKAA1	0.26	17.80	0.03	2.67		0.93	0.93	1.02	0.99	0.99		
IP100307765	AMPKa2	PRKAA2	0.26	17.84	0.02	0.21		0.86	0.89	1.10	0.97	1.04		
IP100413318		PRKAG 1	0.26	17.93	0.03	2.61		0.83	0.86	1.08	0.99	1.01		
IP100013905		PRKAB2	0.26	18.11	0.10	2.85		1.02			1.21	0.92		
IP100151170	TTK	TTK	0.26	18.42	0.03	4.35		1.21	0.80	0.97	0.83	0.82		
IP100220409		PRKAB1	0.26	18.47	0.04	2.82		0.93	0.78	1.01	0.81	0.96		
IP100168807		IPMK	0.26	18.59	0.07				0.96	0.87	0.91	0.89		
IP100301432		TPRKB	0.27	18.95	0.05	2.41		1.04	0.81	1.07	0.95	0.97		
IP100290305	PRPK	TP53RK	0.27	19.06	0.04	2.63		1.05	0.84	0.98	0.85	0.81		

IP100000877	MLK3	MAP3K1 1	0.27	19.08	0.08				0.57	0.87	1.04	0.80			
IP100017305	RSK3	RPS6KA 1	0.27	19.24	0.02	2.81	1.01		0.91	0.95	0.86	0.48	88220	21653.19	
IP100790374		CSNK1 A1	0.27	19.51	0.03	2.78	0.94		1.06	0.85	0.44	0.04	7254	1799.34	
IP100220373		IDE	0.29	20.74	0.12										
IP100413981	FAK		0.29	21.04	0.04	2.67	1.06		0.96	1.03	0.94	0.94			
IP100016613	CK2a1	CSNK2 A1	0.29	21.89	0.03	2.79	0.93		0.93	1.01	0.93	0.89			
IP100855985	MAP3K1	MAP3K1	0.30	21.95	0.05	3.92	1.45		1.00	0.90	1.02	0.86			
IP100005142	FGFR1	FGFR1	0.31	23.18	0.05				0.84	0.66	0.82	0.32	41100	11570.71	
IP100003470	Erk2	MAPK1	0.31	23.18	0.05	2.68	1.00		1.00	1.04	0.95	0.88			
IP100478349	SGK	SGK	0.31	23.70	0.03	2.08	0.97		0.75	1.00	0.77	0.95			
IP100366662	NEK6/NEK7	NEK6	0.32	24.63	0.04										
IP100872391	PYK2		0.33	25.88	0.03	4.29	1.40		0.64	0.74	0.63	0.64			
IP100029488		KHK	0.33	25.71	0.05										
IP100029702	PYK2	PTK2B	0.34	26.86	0.04	3.26	1.12		1.06	1.00	1.09	0.73			
IP100735354			0.35	27.48	0.02										
IP100012443		FIBP	0.35	27.94	0.05	3.00	0.98		0.97	1.02	0.84	0.98			
IP100026689	CDC2	CDC2	0.35	27.99	0.05	2.82	1.09		1.02	1.09	1.04	1.07			

IP100002538	PDK1	PDPK1	0.35	28.08	0.03		1.06	0.85	0.99	0.96	0.96			
IP100000816		YWHAE	0.35	28.17	0.11	4.07	1.15	0.81	1.04	1.12	0.87			
IP100298949	GAK	GAK	0.35	28.55	0.04	2.88	1.05	0.77	0.24	0.06	0.02	335.4	109.20	35.24
IP100216319		YWHAH	0.36	28.86	0.09	4.09		1.16	0.94					
IP100011488	MST1	STK4	0.36	28.88	0.05		1.06	0.89	0.95	0.91	0.83			
IP100408761		CHKA	0.36	29.16	0.03									
IP100014266	BRD3	BRD3	0.36	29.36	0.04	3.42	1.27	1.25	1.03	1.26	0.25	72820	24154.87	
IP100783995		KIAA0528	0.36	29.87	0.10	3.48	1.14	0.96	0.97	0.93	0.84			
IP100413780	PKN3	PKN3	0.37	30.94	0.06		1.48	0.34	0.07	0.02	0.01	51.4	17.85	
IP100216318		YWHAB	0.38	31.30	0.20	4.05	1.24	0.83	1.11	1.21	0.86			
IP100745793		CCNB1	0.38	31.75	0.03	3.15	1.58	0.83	1.07	0.82	0.94			
IP100013880		SFN	0.39	33.23	0.16		1.30	0.78	1.09	1.10	0.85			
IP100013681	YES	YES1	0.40	34.23	0.03			1.03	0.94	0.92	0.34	58830	21566.34	4379
IP100006888		PIP4K2A	0.40	35.21	0.02	3.49	1.03	0.87	0.83	1.12	0.79			
IP100021263		YWHAZ	0.41	36.26	0.13	4.24	1.12	0.86	1.17	1.11	0.81			
IP100028932	MAST3	MAST3	0.42	38.26	0.07			0.76	0.78	0.96	0.74			
IP100337659	TLK2	TLK2	0.43	38.91	0.05	2.55	1.15	0.88	0.96	0.96	0.84			
IP100216470		PIP4K2B	0.43	39.25	0.04	3.37	0.96	0.99	1.06	0.95	0.77			

[illegible]

IP100017726	HSD17B 10	0.51	54.48	0.08					0.49	0.89							
IP100022150	PIP5K1 A	0.52	55.77	0.06		1.41			0.93	1.01	0.90	0.62					
IP100031076	CCNC	0.52	57.00	0.06		1.18	2.35		0.87	1.00	0.81	0.80					
IP100020454	DCK	0.53	57.77	0.05		1.05	2.33		0.83	0.91	0.61	0.85					
IP100029009	PIP5K1 C	0.54	60.39	0.10					0.74	0.97							
IP100470811	SNRK	0.54	60.69	0.05													
IP100020898	RSK2	0.54	62.17	0.03		0.97	2.35		0.97	1.03	0.93	0.81					
IP100329488	ARG	0.55	64.46	0.09		1.30	2.82		0.81	0.86	0.76	0.46	67460	35180.12			
IP100873141	IRE1	0.56	66.65	0.06													
IP100315999	PITSLRE	0.57	68.38	0.05			2.94		0.77	0.86							
IP100298558	PDCD10	0.57	69.80	0.04		1.55	3.34		0.86	1.18	1.10	0.60					
IP100017469	SPR	0.58	70.80	0.06		1.87	2.73		0.89	1.21	1.25	0.90					
IP100221171	ABL	0.58	72.63	0.06			3.23		0.76	0.87	0.70	0.47	61610	33856.99			
IP100292827	MST4	0.59	73.31	0.13					0.81	1.46	0.89	0.56	129600	71728.33			
IP100003031	ISOC2	0.59	75.14	0.10													
IP100604647	HGK/ZC1	0.59	75.73	0.05					1.10	1.08	0.54	0.24	16630	9337.35			
IP100027251	NDR1	0.60	78.33	0.01					0.89	1.01	1.06	0.83					
IP100013212	CSK	0.60	79.47	0.02		1.51			0.83	1.10	1.01	0.76					

IP000218250	DYRL1A	DYRK1 A	0.82	83.84	0.08				0.75	1.42	1.07	1.16			
IP000456870	CHED	CDC2L6	0.82	84.83	0.06	5.31	1.42		0.85	1.00	1.07	1.07			
IP000872754	MST3	STK24	0.83	88.84	0.08				1.06	1.65					
IP000868781	CRK7	CRKRS	0.84	90.68	0.07	3.21	1.04		0.93	1.00	1.02	1.01			
IP000031410	FRAP	FRAP1	0.84	81.64	0.10				0.87	2.19					
IP000221141	p38a	MAPK14	0.84	92.82	0.10		2.16								
IP000260279		ADK	0.84	94.23	0.06		1.63		0.94	1.31	1.06	0.56	146600	90064.19	
IP000177865		NT5DC1	0.85	94.76	0.07				0.93	1.15	1.16	0.46	114500	70496.23	
IP000294528	MET	MET	0.85	94.80	0.08										
IP00021305		CCNH	0.85	96.92	0.05				0.73	0.94	1.02	0.92			
IP000174390		2-PDE	0.86	100.10	0.03				0.84	1.19					
IP000002449		PDE4D	0.86	102.20	0.05	2.48	1.09		0.93	0.89	0.85	0.19	33530	21237.74	
IP00002680		PIK3C2 A	0.87	104.01	0.18										
IP000514275	TNIK/ZC2	TNIK	0.87	107.87	0.19		1.27		0.90	0.91	0.69	0.27	26770	17289.25	
IP00074258	MASTL	MASTL	0.88	109.31	0.09										
IP00002804	PKN2	PKN2	0.89	114.53	0.03	2.87	1.35		0.94	1.00	0.98	0.83			
IP000410485	TAO3	TAKK3	0.89	116.38	0.09	2.95			0.77	1.08					
IP00009086		FN3KRP	0.89	116.78	0.07	2.02	0.95		0.87	0.93	0.90	0.85			
IP000020728		ERCC2	0.89	117.61	0.17										

IP100023629	CDK6	CDK6	0.70	118.79	0.10		0.75												
IP100783214		CCNK	0.70	119.73	0.12	3.84	1.27	0.94	0.90	0.96	0.88								
IP100006025		SART3	0.71	126.21	0.05	2.07	0.90	0.92	0.88	0.88	0.66								
IP100789335	MAP2K4	MAP2K4	0.71	127.45	0.06					0.73	0.79								
IP100220766		GLO1	0.72	133.18	0.07		1.39	0.67	0.82	0.99	0.85								
IP100789612		LIMS1	0.73	143.22	0.04														
IP100218858	MAP2K3	MAP2K3	0.74	149.96	0.05		1.60												
IP100018963		PARVA	0.75	155.43	0.06			0.90	0.92	0.89	0.74								
IP100012197		XTP3TP A	0.75	159.12	0.08	3.39	1.04	1.14	1.17	1.11	1.04								
IP100783305	BUB1	BUB1	0.76	161.39	0.05			0.75	0.69	0.37	0.08	3708	2713.51						
IP100021290		ACLY	0.76	161.61	0.06	3.59	1.98	0.75	1.07	1.07	1.03								
IP100002232	TAO1	TAOK1	0.76	162.43	0.06	2.84	1.02	0.88	1.00	0.77	0.85								
IP100304742	LOK	STK10	0.76	163.64	0.07			0.84	1.13										
IP100033388	DAPK2	DAPK2	0.77	171.44	0.11														
IP100013219	ILK	ILK	0.77	171.70	0.03		1.47	0.85	0.84	0.88	0.87								
IP100003783	MAP2K2	MAP2K2	0.77	177.14	0.03		2.03	0.77	0.83	0.75	0.37	44100	33060.62						
IP100003814	MAP2K6	MAP2K6	0.77	178.30	0.05	2.41	1.36	0.83	0.91	0.87	0.84								
IP100219604	MAP2K1	MAP2K1	0.78	179.85	0.07		1.68	0.84	0.90	0.84	0.49	96950	72963.18						
IP100413108		RPSA	0.78	184.56	0.11	3.92	2.26	0.89	1.37	1.27	1.09								

IP100024709	IKKb	IKKB	0.79	200.75	0.06					0.85	0.55	1.07	0.74			
IP100010080	OSR1	OSR1	0.80	206.63	0.05					0.83	1.02	0.89	1.05			
IP100375824		DPH5	0.80	211.15	0.03			2.72								
IP100847168		RSU1	0.81	216.45	0.07			1.34		0.76	0.93	0.86	0.85			
IP100335101	MSK1	RPS6KA 5	0.81	216.73	0.03											
IP100022827	SLK	SLK	0.81	216.99	0.05	3.22	1.87			0.89	1.08	0.72	0.34	40510	31832.71	
IP100328318		AGL	0.81	217.79	0.08					0.82	0.80	1.07	0.74			
IP100218683		APRT	0.81	222.83	0.05	1.04	1.40			1.11	0.87	0.89	0.77			
IP100300567		DCI	0.82	236.26	0.04	3.25	1.68			0.88	1.12	1.36	1.10			
IP100006754		WDR68	0.83	249.46	0.17	2.58	1.31			0.83	0.78	0.86	0.75			
IP100307165	ROCK2	ROCK2	0.83	254.87	0.08	3.18	1.74			0.83	0.96	0.82	0.12	27210	22084.84	
IP100012891	PHKg2	PHKg2	0.85	295.80	0.10	2.14	1.33									
IP100477763	MRCkb	CDC42B PB	0.85	301.21	0.08	2.35	1.34			0.84	0.80	0.84	0.41	73280	61234.91	
IP100386630	PKACa	PKAC A	0.85	305.35	0.04	2.18	1.76			0.78	0.88	0.74	0.62			
IP100376119	PKACb	PKAC B	0.88	389.53	0.01					0.89	1.00					
IP100007811	CDK4	CDK4	0.81	511.13	0.07	1.77	1.03			0.81	0.85	0.8	0.75			

Tabla 6

PK	INHIBIDOR	K _i – PROTEÓMICA K _i (IC ₅₀ -PROTEÓMICA QUÍMICA)	K _i – ENSAYO QUINASA	Log ₁₀ (K _i -ENSAYO QUINASA)	K _i (ka) / K _i (cp)	Log ₁₀ [K _i (ka) / K _i (cp)]
JNK2	SB203580	918.88	727.55	2.86	1.26	0.10
RIPK2	SB203580	0.83	2.16	0.33	0.38	-0.42
GSK3B	SB203580	1161.76	3117.00	3.49	0.37	-0.43
CK1d	SB203580	174.52	150.90	2.18	1.16	0.06
CK1e	SB203580	648.90	415.05	2.62	1.56	0.19
GAK	SB203580	109.20	35.24	1.55	3.10	0.49
YES	SB203580	21566.34	4379.00	3.64	4.92	0.69
EphB4	SB203580	13955.00	37714.50	4.58	0.37	-0.43
RIPK2	Gefitinib	218.91	46.12	1.66	4.75	0.68
EGFR	Gefitinib	157.61	5.58	0.75	28.26	1.45
BRK	Gefitinib	861.60	279.50	2.45	3.08	0.49
GAK	Gefitinib	45.59	35.24	1.55	1.29	0.11
JNK2	Gefitinib	1113.49	5964.67	3.78	0.19	-0.73
LYN	Gefitinib	2140.18	406.85	2.61	5.26	0.72
EphB4	Gefitinib	955.15	424.30	2.63	2.25	0.35
MET	Gefitinib	1207.51	5462.33	3.74	0.22	-0.66
YES	Gefitinib	8146.40	1343.30	3.13	6.06	0.78

Tabla 7

EXPT	DESCRIPCIÓN	INHIBIDOR INMOV. [μ M]	ETIQUETAS	RATIOS
1	DETERMINACIÓN DE K_i V116742 – ESQUEMA DE ETIQUETADA RECÍPROCO	52	L: 2° ELUATO DE PERLAS V116742 M: ELUATO DE PERLAS CONTROL H: 1r ELUATO DE PERLAS V116742	$r_1(2. \text{ INC}/1. \text{ INC}) = \text{L/H}$ NORMALIZADO 1 $r_1(\text{CONTROL}/1. \text{ INC}) = \text{M/H}$ NORMALIZADO 1
2	DETERMINACIÓN DE K_i V116742 – ESQUEMA DE ETIQUETADO NORMAL	52	L: 1r ELUATO DE PERLAS V116742 M: ELUATO DE PERLAS CONTROL H: 2° ELUATO DE PERLAS V116742	$r_2(2. \text{ INC}/1. \text{ INC}) = \text{H/L}$ NORMALIZADO 2 $r_2(\text{CONTROL}/1. \text{ INC}) = \text{M/L}$ NORMALIZADO 2
3	DETERMINACIÓN DE K_i V116742 – CONCENTRACIÓN DE LIGANDO CONTROL	59	L: INCUBACIÓN DE 3mG DE PROTEÍNA CON PERLAS V116742 H: INCUBACIÓN DE 1mG DE PROTEÍNA CON PERLAS V116742	$r(3 \text{ mG}/1 \text{ mG LISADO}) =$ L/H NORMALIZADO 3

(continuación)

EXPT	DESCRIPCIÓN	INHIBIDOR INMOV. [mM]	ETIQUETAS	RATIOS
4	DETERMINACIÓN DE K_i VI16742 - TIEMPO DE INCUBACIÓN CONTROL	59	L: 5 h TIEMPO DE INCUBACIÓN H: 2.5 h TIEMPO DE INCUBACIÓN	$r_1(5 \text{ h}/2.5 \text{ h INC. TIEMPO}) =$ L/H NORMALIZADO 4
5	DETERMINACIÓN DE IC_{50} SB203580 - 0, 0.1, 1 μM - EXPERIMENTO 1	59	L: COMPETICIÓN CON 0 nM SB203580 M: COMPETICIÓN CON 100 nM SB203580 H: COMPETICIÓN CON 1000 nM SB203580	$r_1(100 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) = \text{M/L}$ NORMALIZADO 5 $r_1(1000 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) = \text{H/L}$ NORMALIZADO 5
6	DETERMINACIÓN DE IC_{50} SB203580 - 0, 10, 100 μM - EXPERIMENTO 1	59	L: COMPETICIÓN CON 0 nM SB203580 M: COMPETICIÓN CON 10000 nM SB203580 H: COMPETICIÓN CON 100000 nM SB203580	$r_1(10000 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) =$ M/L NORMALIZADO 6 $r_1(100000 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) =$ H/L NORMALIZADO 6
7	DETERMINACIÓN DE IC_{50} SB203580 - 0, 0.1, 1 μM - EXPERIMENTO 2	59	L: COMPETICIÓN CON 0 nM SB203580 M: COMPETICIÓN CON 100 nM SB203580 H: COMPETICIÓN CON 1000 nM SB203580	$r_2(100 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) = \text{M/L}$ NORMALIZADO 7 $r_2(1000 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) = \text{H/L}$ NORMALIZADO 7
8	DETERMINACIÓN DE IC_{50} SB203580 - 0, 10, 100 μM - EXPERIMENTO 2	59	L: COMPETICIÓN CON 0 nM SB203580 M: COMPETICIÓN CON 10000 nM SB203580 H: COMPETICIÓN CON 100000 nM SB203580	$r_2(10000 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) =$ M/L NORMALIZADO 8 $r_2(100000 \text{ nM}/0 \text{ nM SB}) =$ H/L NORMALIZADO 8

Tabla 8

Proteína líder	PK	Gen	Γ_{promedio} (2. inc / 1. inc)	K_i (AX14596) [μM]	Γ_{promedio} (control/1. inc)	r (3 mg/ 1mg lysate)	r (5 hr/ 2.5 h tiempo inc.)	Γ_{promedio} (10 nM/0 nM Gef.)	Γ_{promedio} (100 nM/ 0 nM Gef.)	Γ_{promedio} (1000 nM/ 0 nM Gef.)	Γ_{promedio} (10000 nM/0 nM Gef.)	IC ₅₀ (Gef.) [nM]	K(Gef) [nM]	IC ₅₀ -K _i [nM], ensayo quinasa (Gef)
IP00021817	RIPK2	RIPK2	0.06	6.19	0.02	2.88	0.90	0.74	1.03	0.74	0.31	3757	218.91	46.12
IP00027778		NUDT12	0.14	16.14	0.04	2.24	0.91	1.04	0.93	0.92	0.09	3221	447.35	
IP00018873		NAMPT	0.29	41.20	0.04	7.48	0.39	0.71	0.74	0.73	0.92			
IP00018274	EGFR	EGFR	0.31	44.48	0.03	2.65	0.90	0.70	0.88	0.33	0.06	512.3	157.61	5.68
IP00015927	BRK	PTK6	0.31	45.43	0.02	2.66	0.96	0.86	0.96	0.75	0.20	2760	861.60	279.50
IP000873294		BLMH	0.35	53.58	0.08	11.91	1.31	0.82	0.53	0.43	0.11	223.4	77.89	
IP0029849	GAK	GAK	0.45	82.05	0.04	2.59	1.05	0.90	0.53	0.13	0.02	101.2	45.59	35.24
IP000828081	CaMK2 α	CAMK2D	0.47	87.22	0.07	2.39	1.13	0.89	1.11	0.91	0.93			
IP00016572		SNRPG	0.47	87.62	0.16	2.54		0.85	1.09	0.72	0.89			
IP000846849	CaMK2 β	CAMK2G	0.48	93.37	0.04	2.45	1.17	0.85	1.08	1.01	0.92			
IP00039266		SNRPE	0.51	105.76	0.07	2.57	1.88	0.70	1.11	0.74	0.93			
IP00418639		ACAD10	0.52	107.62	0.08	8.45	0.48	1.17	0.86	1.07	0.24	5531	2865.59	
IP00024673	JNK2	MAPK9	0.52	109.65	0.03	2.58	0.85	0.86	0.84	0.88	0.16	2130	1113.49	5864.67
IP00221141	p38 α	MAPK14	0.63	167.83	0.03	2.87		0.88	0.97	0.97	0.64			
IP00304648	Sgk085	MYLK3	0.65	185.76	0.00	2.56	0.97	0.97	1.01	0.88	0.53	11960	7772.27	

Proteína líder	PK	Gen	r _{promedio} (2. inc / 1. inc)	K _i (AX14596) [μM]	r _{promedio} (control/1. inc)	r(3 mg/ 1mg lysate)	r (5 h/ 2.5 h tiempo inc.)	r _{promedio} (10 nM/ 0 nM Gef.)	r _{promedio} (100 nM/ 0 nM Gef.)	r _{promedio} (1000 nM/ 0 nM Gef.)	r _{promedio} (10000 nM/ 0 nM Gef.)	IC ₅₀ (Gef.) [nM]	K _i (Gef) [nM]	IC ₅₀ ~K _i [nM], ensayo quinasa (Gef)
IP000872474	LYN	LYN	0.86	185.32	0.07	2.14	0.88	0.85	1.00	0.89	0.31	3237	2140.18	406.85
IP00029219	ALK2	ACVR1	0.87	201.86	0.15	2.57	1.17	0.76	1.25	0.77	0.85			
IP00021275	EphB2	EPH2	0.86	213.19	0.04	3.41	1.06	0.88	0.90	0.85	0.33	4980	3388.83	
IP00289342	EphB4	EPH4	0.71	241.53	0.05	2.86	0.96	0.79	0.89	0.58	0.14	1351	955.15	424.30
IP00029273	MET	MET	0.73	266.54	0.06	2.30	1.12	0.74	1.00	0.57	0.23	1661	1207.51	5462.33
IP00002857	p38a	MAPK14	0.77	331.74	0.08	2.74	1.15	0.88	1.04	0.92	0.64			
IP00008557		IGF2BP1	0.79	367.24	0.19									
Proteína líder	PK	Gen	r _{promedio} (2. inc / 1. inc)	K _i (AX14596) [μM]	r _{promedio} (control/1. inc)	r(3 mg/ 1mg lysate)	r (5 h/ 2.5 h tiempo inc.)	r _{promedio} (10 nM/ 0 nM Gef.)	r _{promedio} (100 nM/ 0 nM Gef.)	r _{promedio} (1000 nM/ 0 nM Gef.)	r _{promedio} (10000 nM/ 0 nM Gef.)	IC ₅₀ (Gef.) [nM]	K _i (Gef) [nM]	IC ₅₀ ~K _i [nM], ensayo quinasa (Gef)
IP00008334	PKD2	PRKD2	0.78	385.13	0.08	2.53	0.86	0.85	0.97	0.84	0.38	5883	4688.38	
IP00027983		CDA	0.80	402.28	0.09	3.09		0.90	1.03	0.96	0.77			
IP00013981	YES	YES1	0.87	659.37	0.05	2.03	0.88	0.84	1.15	0.86	0.49	9385	8146.40	1343.30
IP00304048	MNK1	MKNK1	0.90	921.63	0.04	2.94	1.05	0.76	1.00	0.73	0.37	4429	3995.09	
IP00015638	PKD3	PRKD3	0.84	1508.12	0.08	2.48	1.05	0.88	1.05	0.98	0.41	8213	7701.80	

Proteína líder	PK	Gen	r_{promedio} (2. inc / 1. inc)	K_i (AX14596) [μM]	r_{promedio} (control/1. inc)	r (5 h/ 2.5 h tiempo inc.)	r_{promedio} (10 nM/ 0 nM Gef.)	r_{promedio} (100 nM/ 0 nM Gef.)	r_{promedio} (1000 nM/ 0 nM Gef.)	r_{promedio} (10000 nM/ 0 nM Gef.)	IC_{50} (Gef.) [nM]	K_i (Gef) [nM]	$\text{IC}_{50}\text{-}K_i$ [nM], ensayo quinasa (Gef)
IP100017469		SPR	0.95	1858.55	0.02	2.43	1.04	1.10	1.01	0.77			
IP100478315		RPL7A	0.95	2103.58	0.17		0.92	0.88	0.59	0.79			
IP100472171		RPL7	0.96	2313.25	0.19		0.84	1.08	0.86	0.98			
IP100398135		RPL27A	0.97	2829.01	0.06	1.12	0.87	1.05	0.81	1.03			
IP100027729	CK1e	CSNK1E	0.98	4082.93	0.09	1.23	0.80	1.00	0.84	0.59	13050	12737.71	

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para evaluar la afinidad de unión de un componente diana de un analito a un compuesto que comprende
 - (a) poner en contacto una primera alícuota del analito con un soporte sólido en el que se inmoviliza el compuesto;
 - (b) poner en contacto una segunda alícuota del analito con un soporte sólido como en (a), separando posteriormente la segunda alícuota del analito de dicho soporte sólido;
 - (c) poner de nuevo en contacto el analito separado de la etapa (b) con un soporte sólido como en (a);
 - (d) determinar las cantidades del componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (c); y
 - (e) comparar la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en la etapa (a) con la cantidad de componente diana unido al soporte sólido de la etapa (c);

en donde la comparación de la etapa (e) se usa para determinar el valor de K_d de la unión de dicho compuesto inmovilizado a dicho componente diana.
2. Procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente poner en contacto una tercera alícuota de dicho analito con un soporte sólido como en (a), que no tiene, sin embargo, dicho compuesto inmovilizado en él, y determinar la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido;

en el que la etapa (e) comprende adicionalmente comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (c) con la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido que no tiene dicho compuesto inmovilizado en él.
3. Procedimiento para evaluar la afinidad de unión de un componente diana de un analito a un compuesto que comprende
 - (a) poner en contacto una primera alícuota del analito con un soporte sólido en el que se inmoviliza el compuesto;
 - (b) poner en contacto una segunda alícuota del analito con un soporte sólido como en (a) en el que dicho compuesto está, sin embargo, inmovilizado a una concentración más alta que en (a);
 - (c) opcionalmente poner en contacto una tercera alícuota del analito con un soporte sólido como en (a) en el que dicho compuesto está, sin embargo, inmovilizado a una concentración mayor que en (b);
 - (d) determinar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido de las etapas (a) y (b) y, si el procedimiento comprende la etapa (c), también la cantidad de componente diana unido al soporte sólido de la etapa (c); y
 - (e) comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (b) y, si el procedimiento comprende la etapa (c), también la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en la etapa (c);

en donde la comparación de la etapa (e) se usa para determinar el valor de K_d de la unión de dicho compuesto inmovilizado a dicho componente diana.
4. Procedimiento de la reivindicación 3, en el que la relación de las concentraciones a las que se inmoviliza el compuesto en el soporte sólido en las etapas (a) y (b) se selecciona de las relaciones de aproximadamente 1:2, aproximadamente 1:3, aproximadamente 1:4, aproximadamente 1:5, aproximadamente 1:6, aproximadamente 1:7, aproximadamente 1:8, aproximadamente 1:9 o aproximadamente 1:10.
5. Procedimiento de la reivindicación 3, en el que la relación de las concentraciones a las que el compuesto se inmoviliza en el soporte sólido en las etapas (a), (b) y (c) se selecciona de las relaciones de aproximadamente 1:2:4, aproximadamente 1:3:9, aproximadamente 1:4:16, aproximadamente 1:5:25, aproximadamente 1:6:36, aproximadamente 1:7:49, aproximadamente 1:8:64, aproximadamente 1:9:81 o aproximadamente 1:10:100.
6. Procedimiento de las reivindicaciones 3 a 5, que comprende adicionalmente poner en contacto una cuarta alícuota de dicho analito con un soporte sólido como en (a) que, sin embargo, no tiene dicho compuesto inmovilizado en él, y determinar la cantidad de componente diana unido a dicho soporte

sólido; donde la etapa (e) comprende adicionalmente comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (b) y, si el procedimiento comprende la etapa (c), también la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en la etapa (c) con la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido que no tiene dicho compuesto inmovilizado en él.

5

7. Procedimiento para evaluar la afinidad de unión de un componente diana de un analito a un compuesto competidor que comprende

10

(a) poner en contacto una primera alícuota del analito con un soporte sólido en el que se inmoviliza un compuesto, que se une al componente diana con un valor de K_d dado, en donde se lleva a cabo el contacto en presencia de dicho compuesto competidor;

(b) poner en contacto una segunda alícuota del analito con un soporte sólido como en (a) en presencia de dicho compuesto competidor, en donde la concentración de dicho compuesto competidor es mayor que en (a);

15

(c) poner en contacto opcionalmente una tercera alícuota del analito con un soporte sólido como en (a) en presencia de dicho compuesto competidor, en donde la concentración de dicho compuesto competidor es mayor que en (b);

20

(d) determinar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (b) y, si el procedimiento comprende la etapa (c), también la cantidad del componente diana unido al soporte sólido en la etapa (c); y

(e) comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (b) y, si el procedimiento comprende la etapa (c), también la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en la etapa (c);

25

en donde la comparación de la etapa (e) se utiliza para determinar el valor de K_d de la unión de dicho compuesto competidor a dicho componente diana.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, en donde dicho compuesto competidor se añade al analito antes de la puesta en contacto en las etapas (a) a (c).

30

9. Procedimiento de la reivindicación 7 u 8, que comprende adicionalmente poner en contacto una cuarta alícuota de dicho analito con un soporte sólido como en (a), en el que el contacto se realiza, sin embargo, en ausencia de dicho compuesto competidor;

35

en el que la etapa (e) comprende adicionalmente comparar las cantidades de componente diana unido al soporte sólido en las etapas (a) y (b) y, si el procedimiento comprende la etapa (c), también la cantidad de componente diana unido al soporte sólido en la etapa (c) con la cantidad de componente diana unido a dicho soporte sólido en ausencia de dicho compuesto competidor.

40

10. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los componentes diana del analito se marcan con un marcador detectable.

11. Procedimiento de la reivindicación 10, en el cual dicho marcador detectable es diferente en cada alícuota.

45

12. Procedimiento de las reivindicaciones 10 ó 11, en el cual los componentes diana del analito son péptidos o proteínas, dicho marcaje se realiza mediante el procedimiento SILAC (marcaje de isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular) y en el cual dicha determinación de acuerdo con la etapa (d) se realiza mediante análisis cuantitativo de proteína a través de espectrometría de masas.

50

13. Procedimiento de las reivindicaciones 11 ó 12, en el cual la determinación de la etapa (d) se realiza combinando dichos componentes diana unidos en una muestra y detectando las cantidades de los componentes diana diferencialmente marcados en dicha muestra.

55

14. Procedimiento de la reivindicación 13, en el cual los componentes diana se eluyen del soporte sólido antes de combinarse en dicha muestra.

15. Procedimiento de las reivindicaciones 7 a 14, en donde el compuesto competidor y el compuesto inmovilizado en el soporte sólido son el mismo.

60

16. Procedimiento de las reivindicaciones 7 a 14, en donde el compuesto competidor y el compuesto inmovilizado en el soporte sólido son diferentes.

17. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el compuesto está presente durante dichas etapas de contacto en un exceso molar en comparación con el componente diana.
- 5 18. Procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual dichas etapas de contacto se realizan simultáneamente.
19. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el analito se selecciona del grupo que consiste en un proteoma, una mezcla de diferentes proteomas, un
10 extracto o lisado celular, un extracto o lisado tisular, un sobrenadante de cultivo celular, un sobrenadante de cultivo tisular o un fluido corporal.
20. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el cual el proteoma está presente en o se deriva de una célula única o un cultivo celular, una mezcla de células, un tejido, un órgano o un
15 organismo.
21. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual dicho compuesto unido al soporte sólido y/o dicho compuesto competidor se selecciona de enzimas, polipéptidos, péptidos, anticuerpos y fragmentos de los mismos, oligo o polisacáridos, proteoglicanos,
20 entidades químicas, moléculas pequeñas, fármacos, metabolitos o profármacos.
22. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual dicho compuesto inmovilizado está presente en una concentración definida en el soporte sólido.
- 25 23. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en filtros, portaobjetos de vidrio, superficies de silicio, perlas y una microserie química adaptada.
- 30 24. Procedimiento de la reivindicación 23, en el cual dichas perlas son perlas de sefarsa, opcionalmente epoxi-activadas o NHS-activadas o perlas de agarosa.
25. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el compuesto inmovilizado se inmoviliza en el soporte sólido mediante adsorción, absorción, enlace iónico, enlace covalente, un grupo amino o grupo carboxi o grupo hidroxilo, interacciones (strept)avidina-
35 biotina o tiol-oro.
26. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual dicho marcador se selecciona del grupo que consiste en radiomarcadores, marcadores de tinción, marcadores que pueden detectarse con anticuerpos, marcadores enzimáticos, marcadores
40 fosforescentes, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, fosfatasa, avidina, estreptavidina, biotina, TAP, peroxidasas y marcadores que tienen una masa detectable.
27. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual dicho contacto se realiza esencialmente en condiciones fisiológicas.
45
28. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual dicho contacto se realiza usando un tampón adecuado y, opcionalmente, un cofactor tal como NAD⁺/NADH, GMPc, NADP⁺/NADPH, ATP, ADP o AMPc.
- 50 29. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10, 11 y 13-28, en el cual la determinación de acuerdo con la etapa (d) comprende detectar el marcador mediante un método seleccionado de métodos de detección de radioactividad, métodos de detección de fluorescencia, métodos de detección de luminiscencia, métodos de detección por tinción, métodos de detección enzimática y espectrometría de masas.
- 55 30. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo dicho procedimiento evaluar simultáneamente la unión de una multitud de componentes diana del analito al compuesto inmovilizado y/o al compuesto competidor.
- 60 31. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho procedimiento se realiza en su totalidad o al menos en parte de una manera de alto rendimiento.

Figura 1a

(i) IVA1 (Asociación *in vitro*: Composición 1)

Dependencia de dosis de la unión

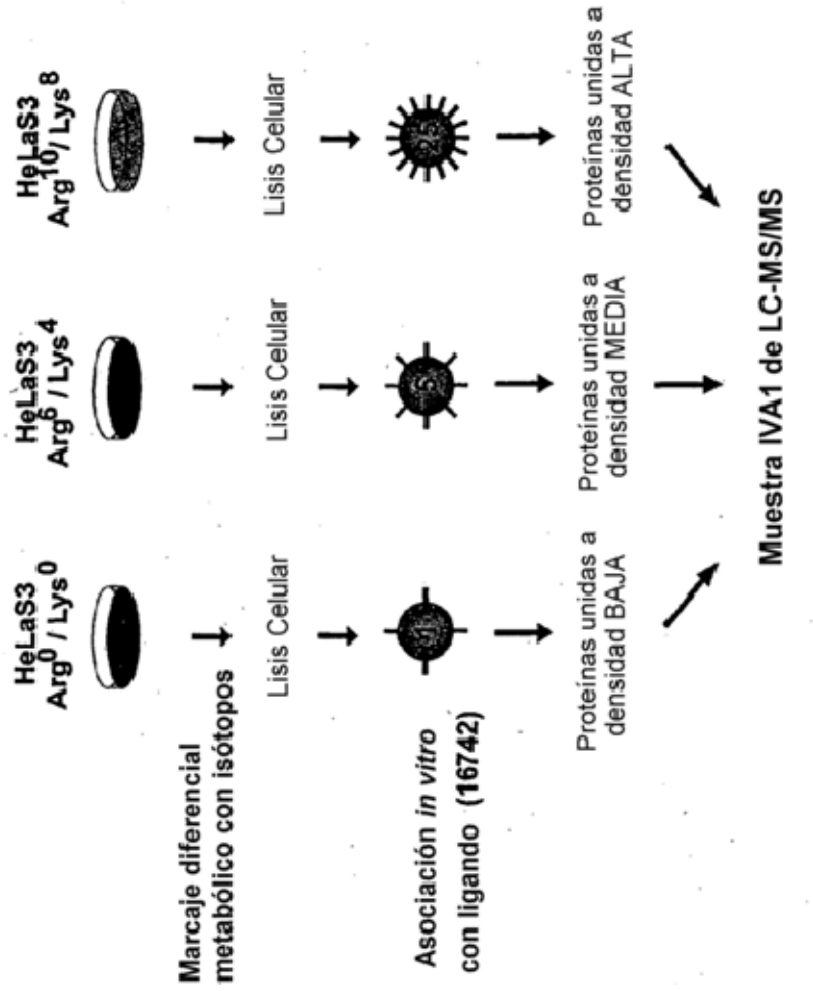


Figura 1b

(i) IVA2 (Asociación *in vitro*: Composición 2)

Unión de fondo, factor de enriquecimiento

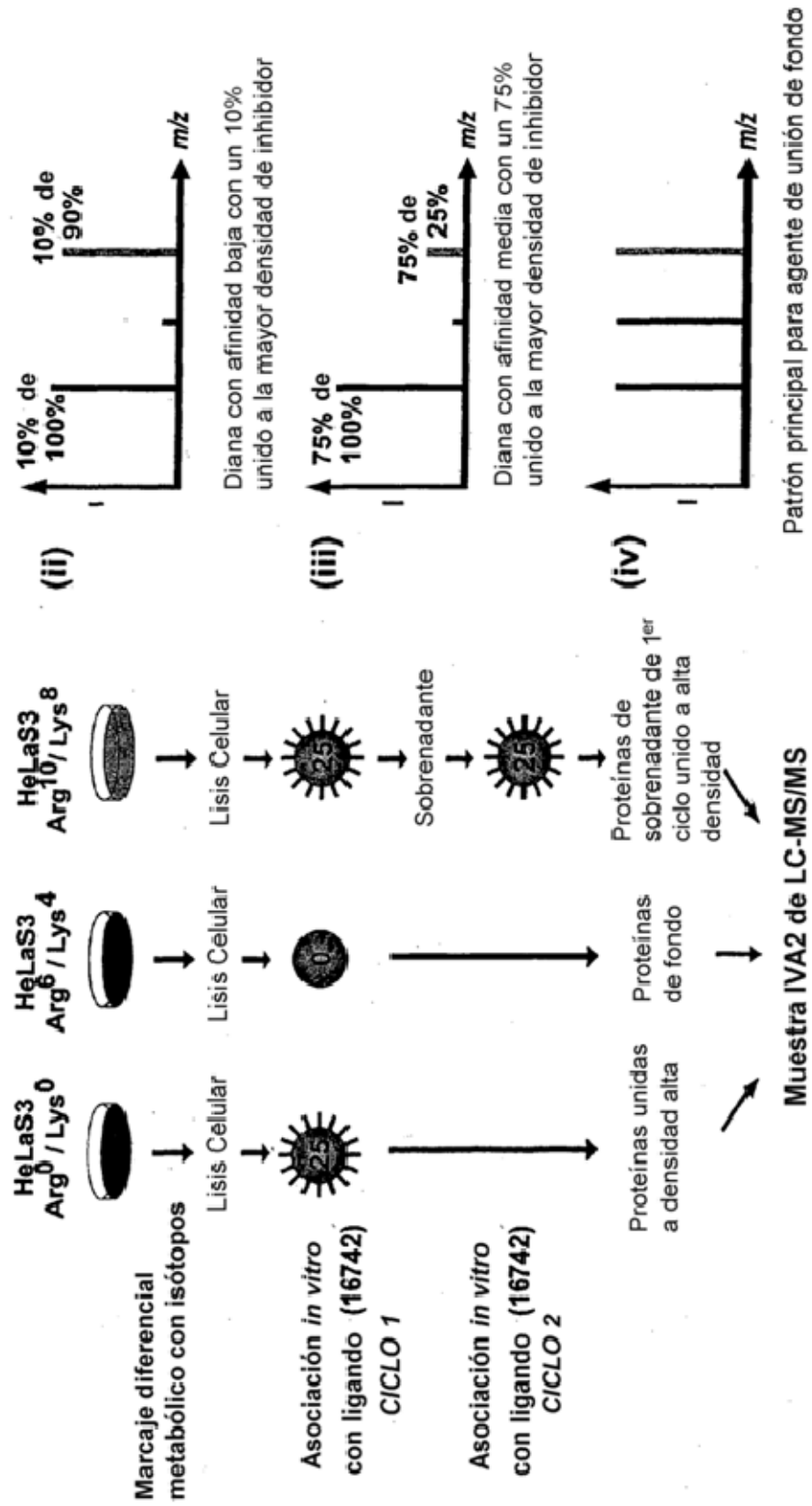


Figura 1c

(i) Verificación de exceso molar de ligando inmovilizado sobre sus dianas

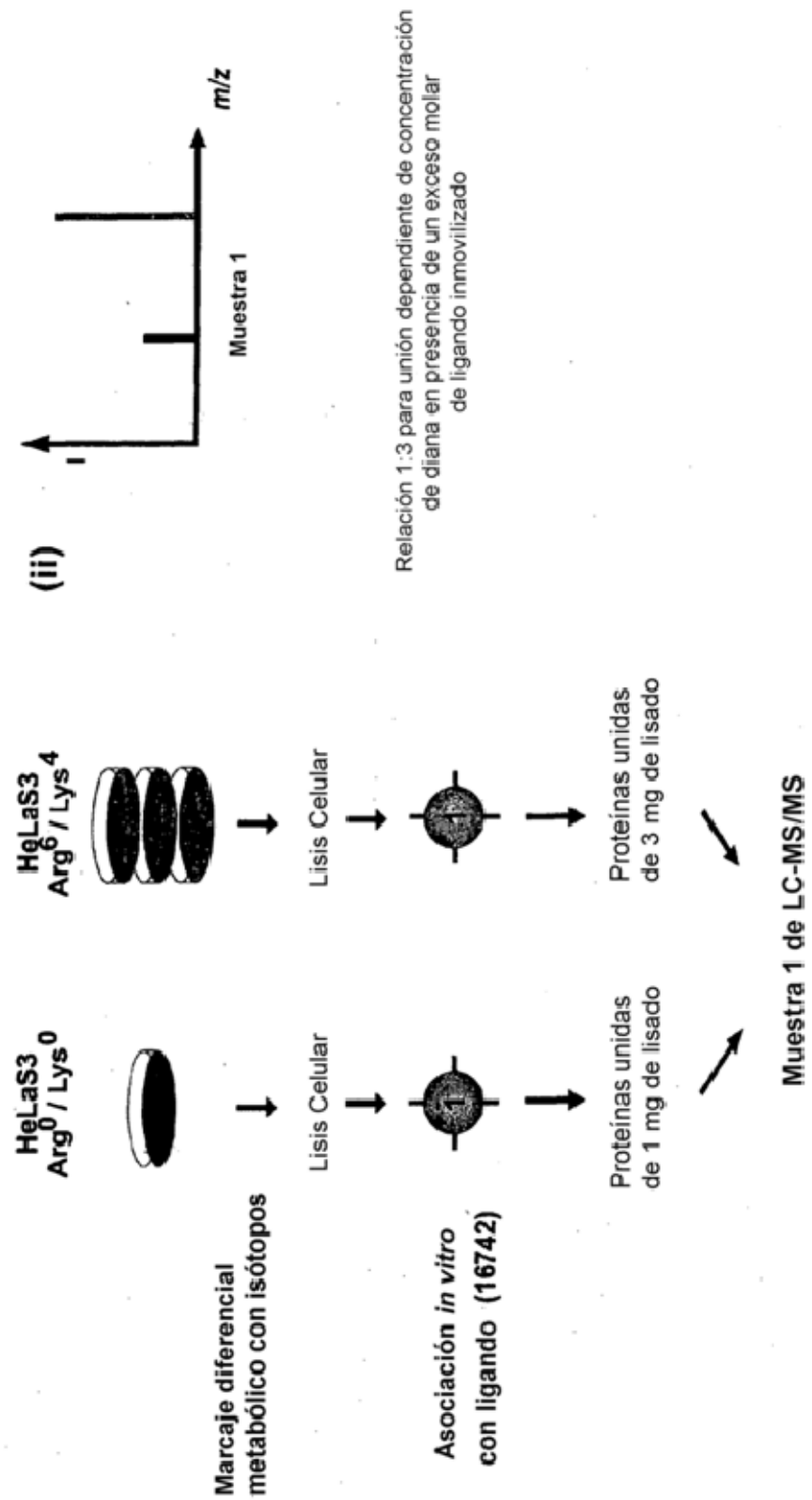
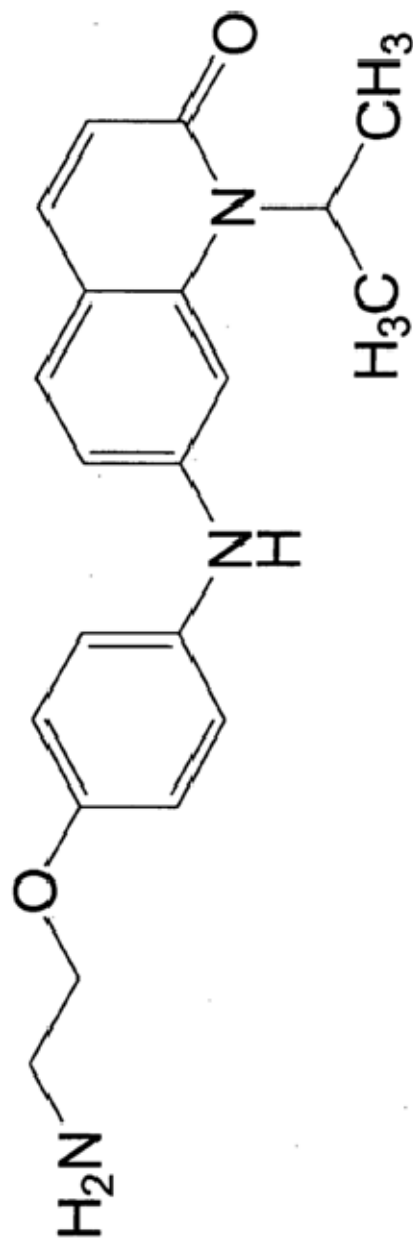


Figura 2 a

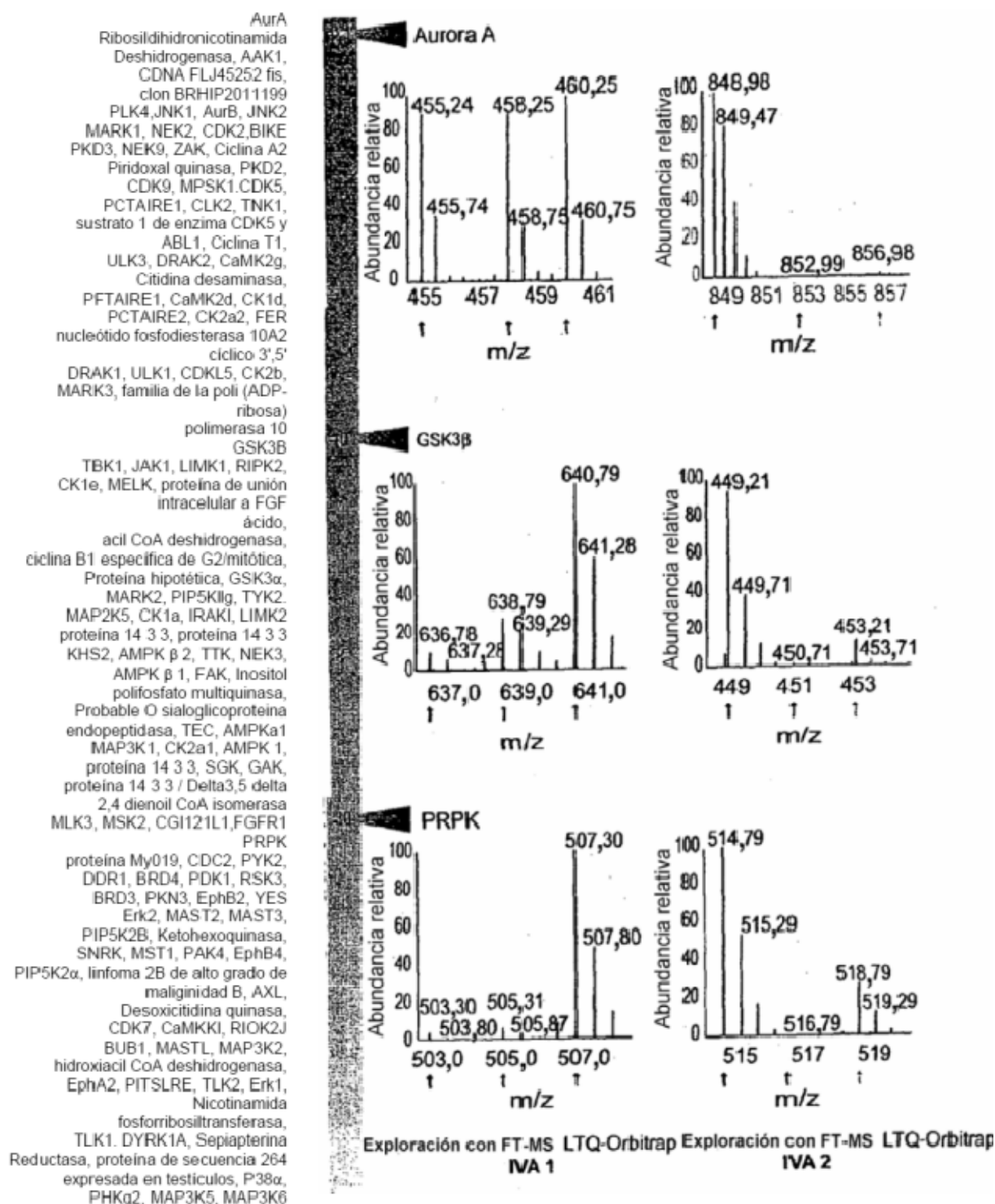
K_d de proteínas diana (μM)**Figura 2b**

Figura 2c

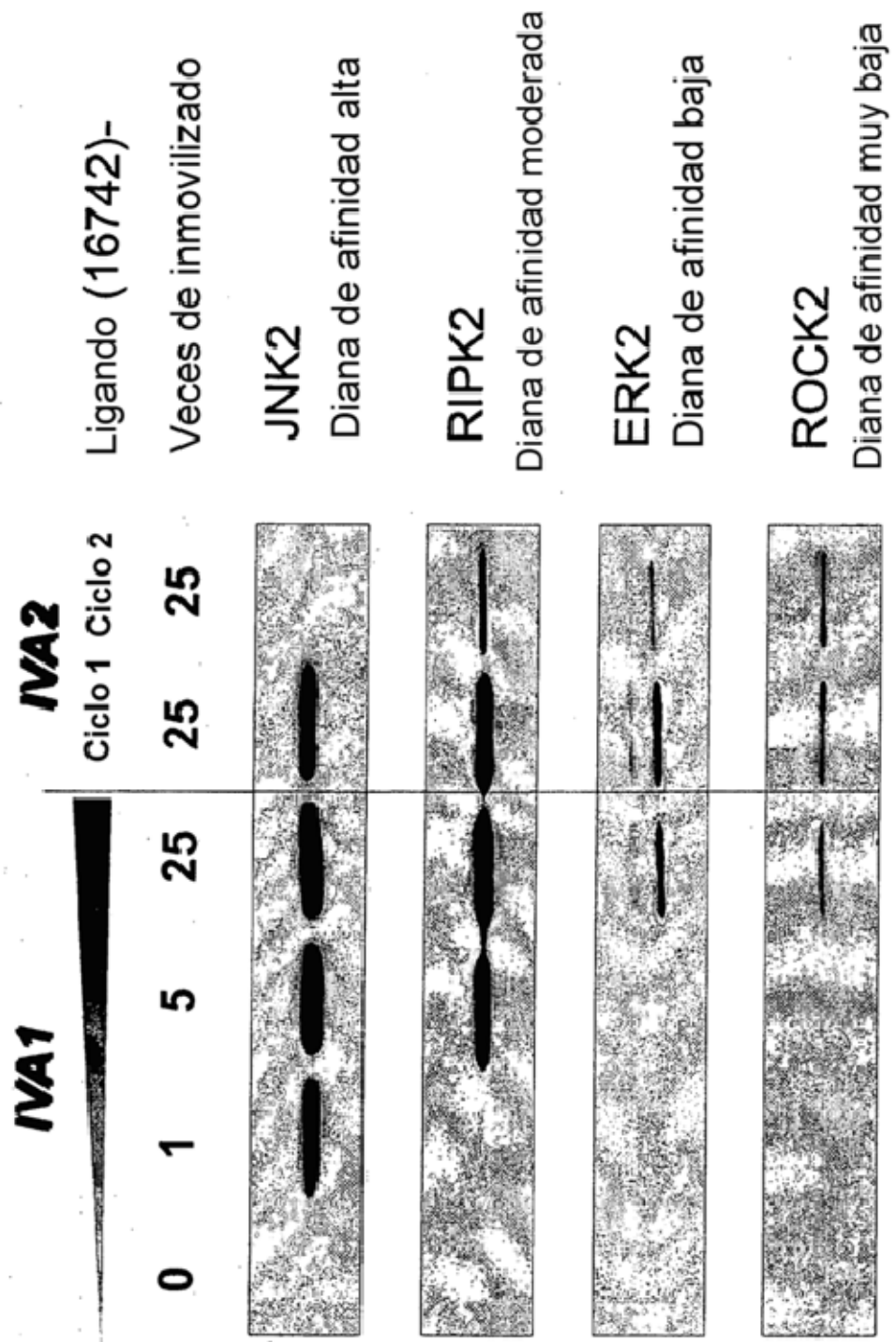


Figura 2d

- Dianas de afinidad alta ($K_d < 10 \mu M$)
- Dianas de afinidad moderada ($K_d = 10-30 \mu M$)
- Dianas de afinidad baja ($K_d > 30 \mu M$)

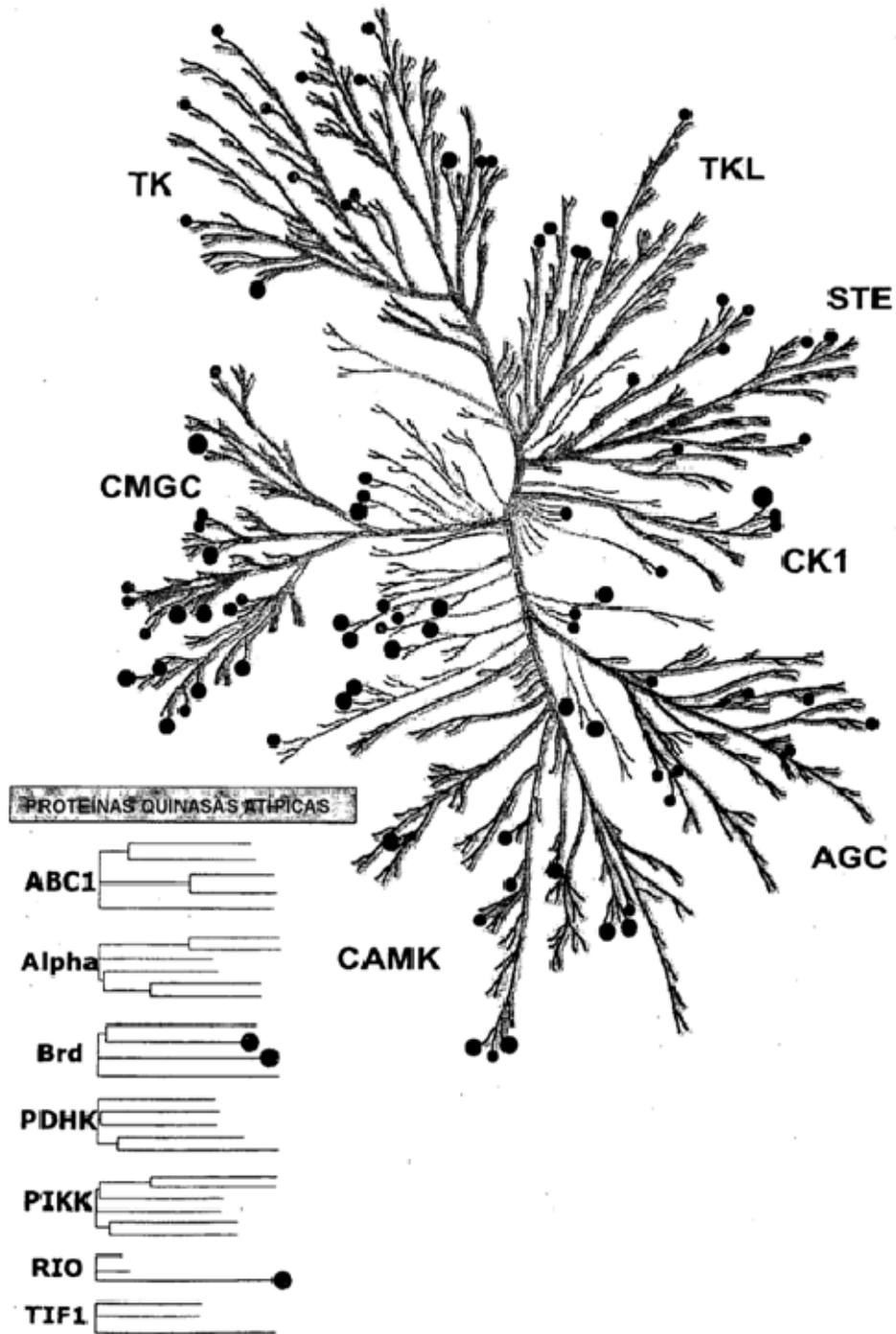


Figura 3a

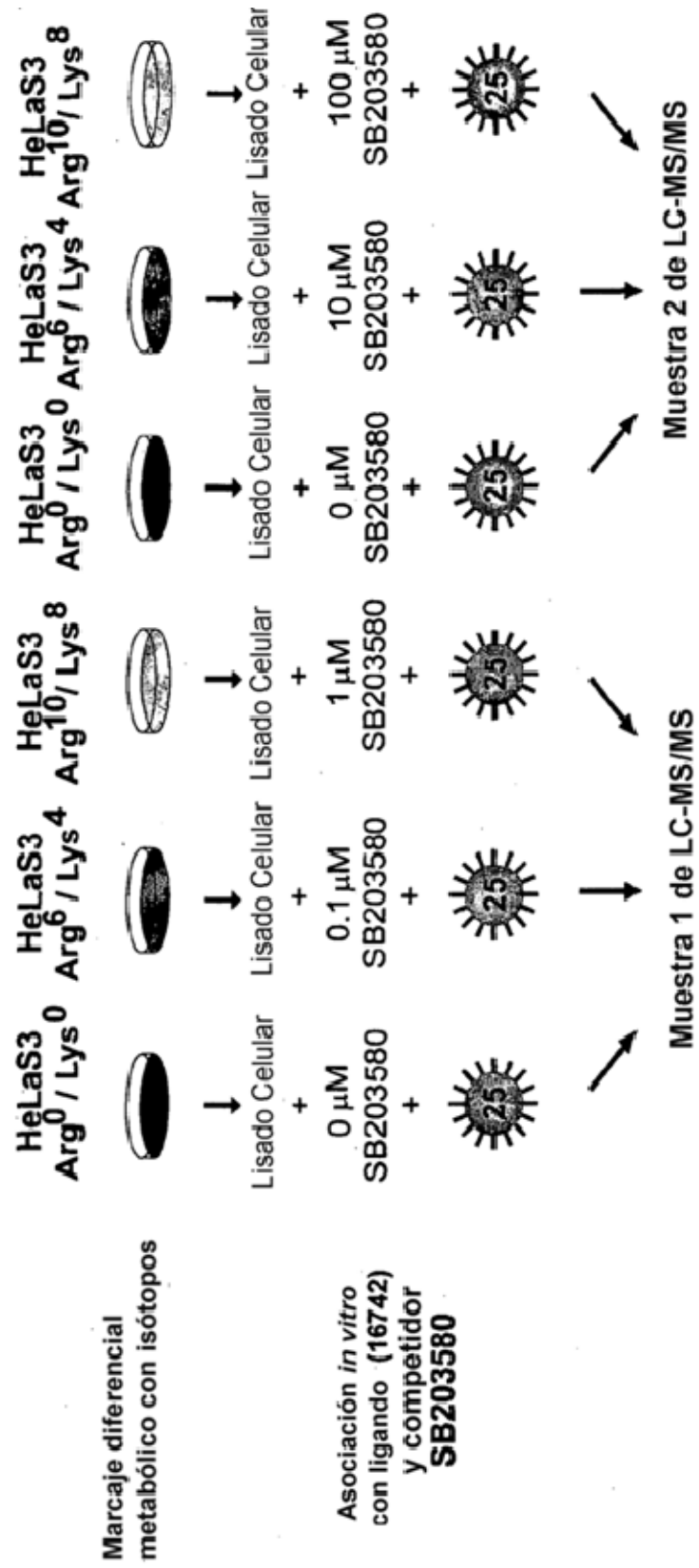


Figura 3b

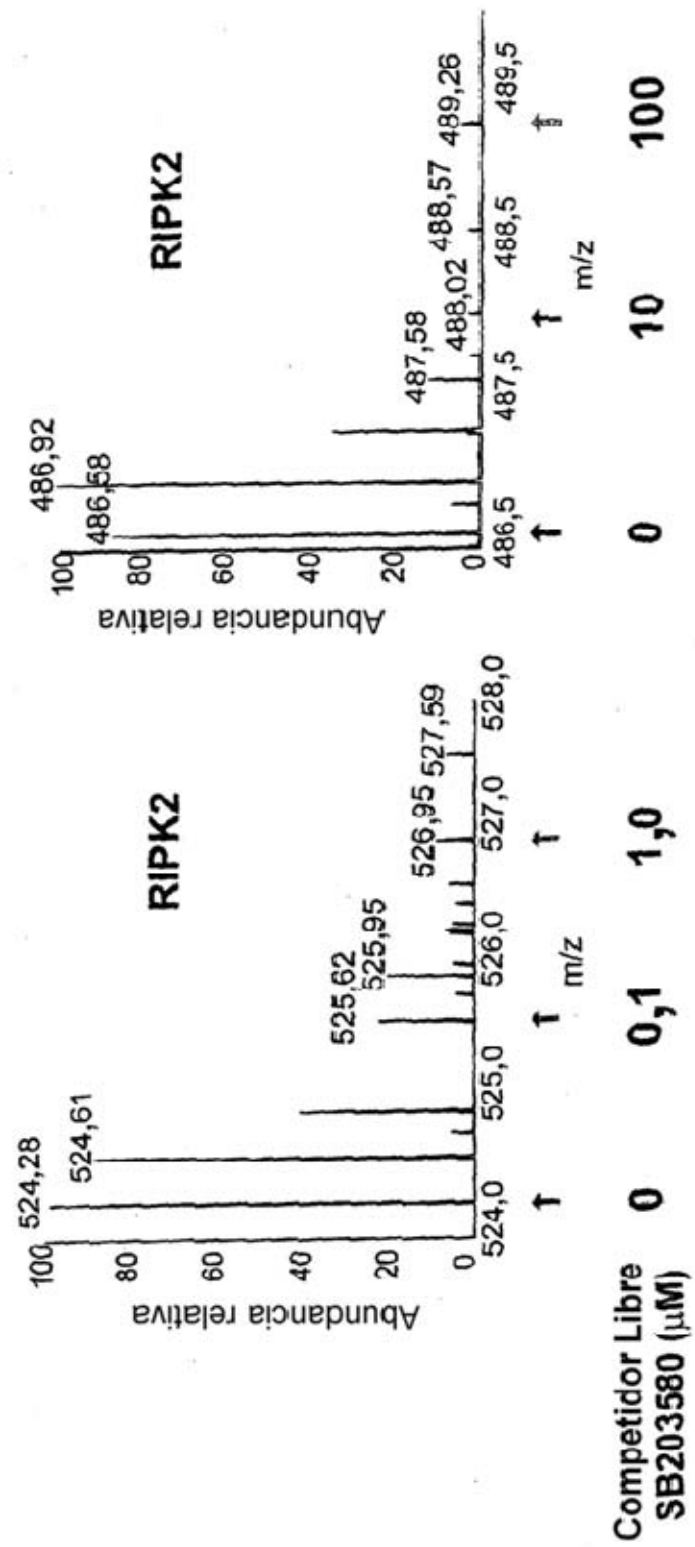


Figura 3c

Competición con SB203580

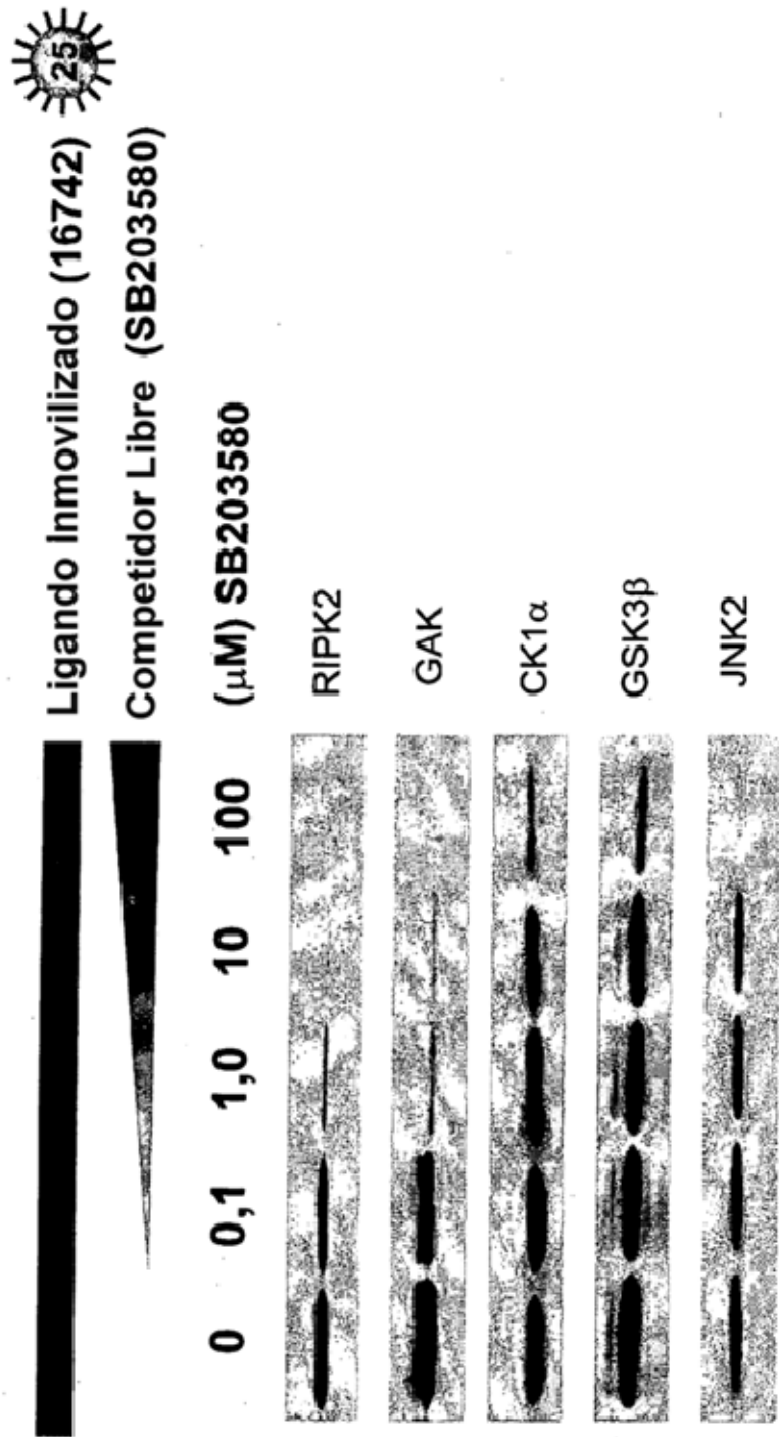


Figura 4

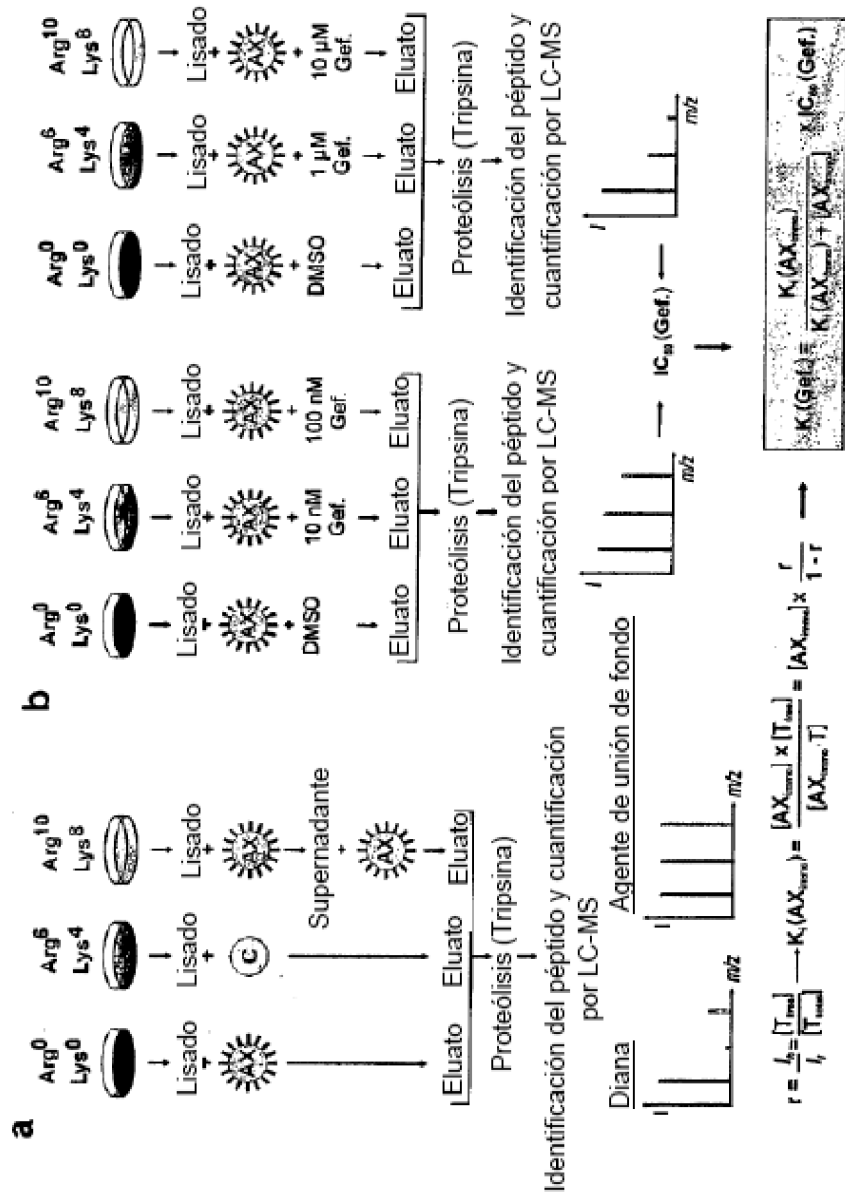


Figura 5b

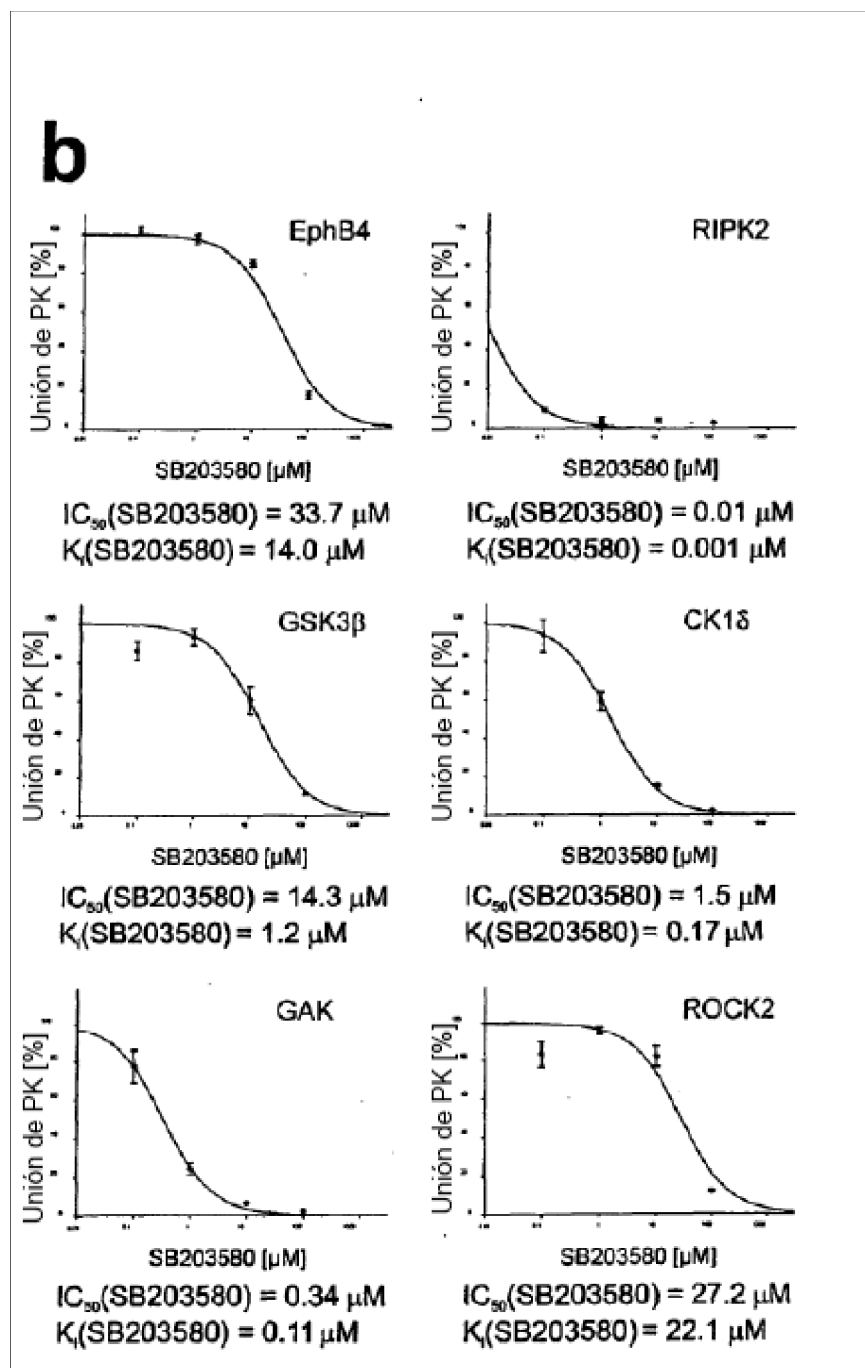
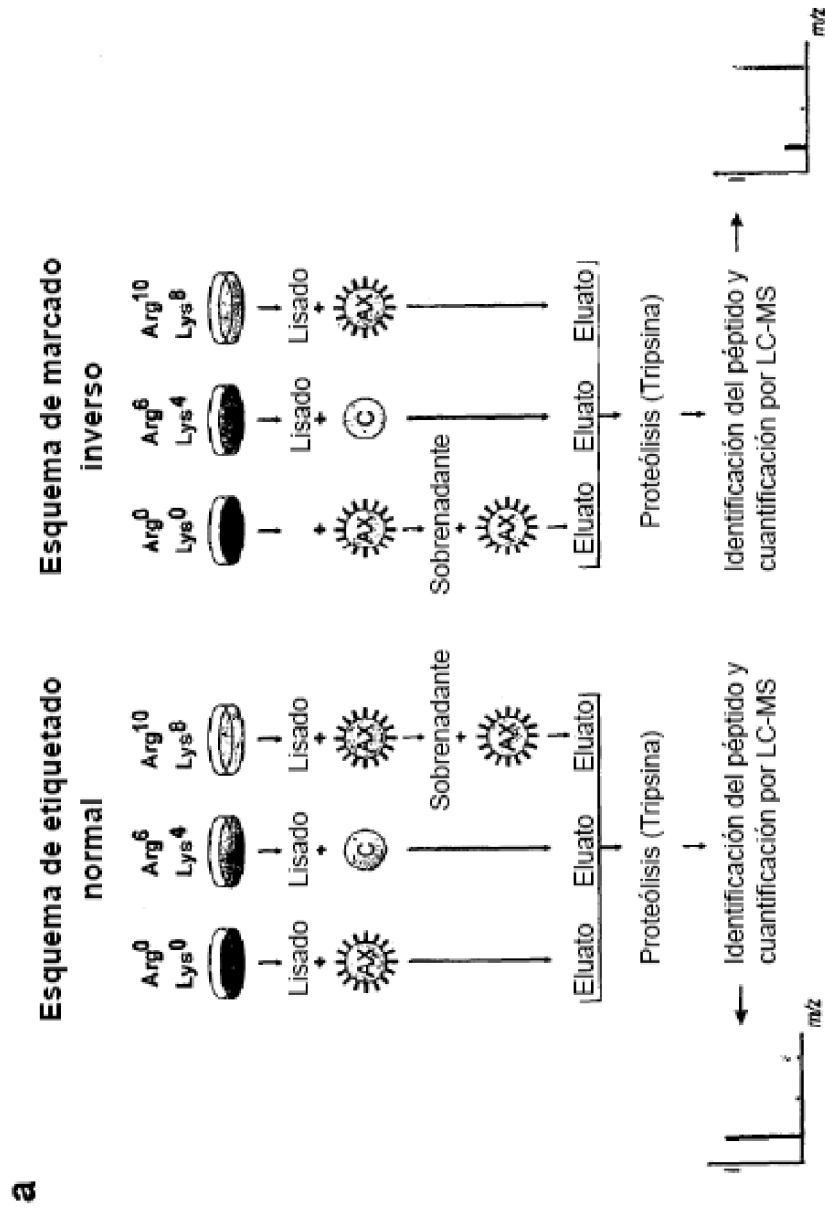


Figura 6a



Figuras 6b-d

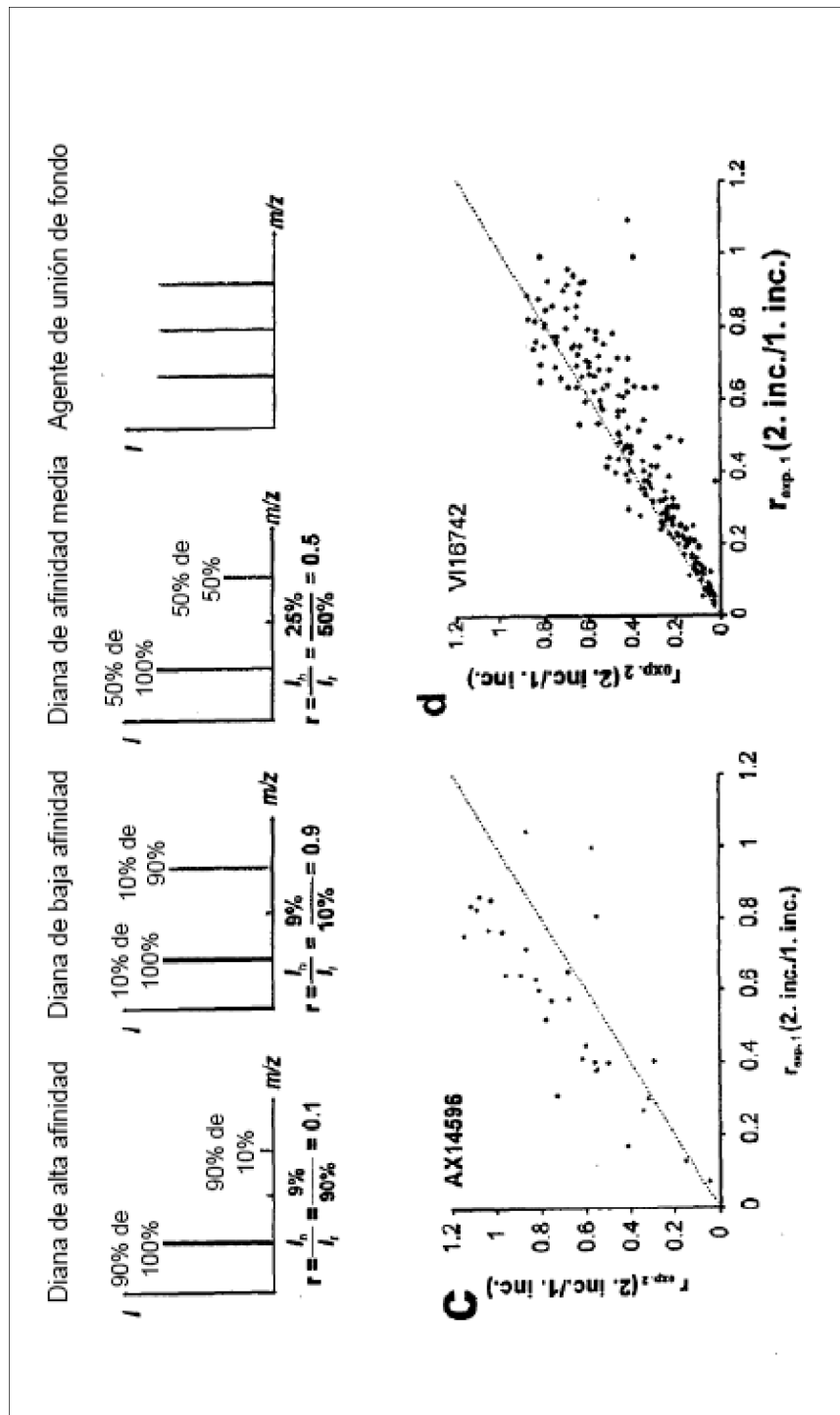


Figura 7

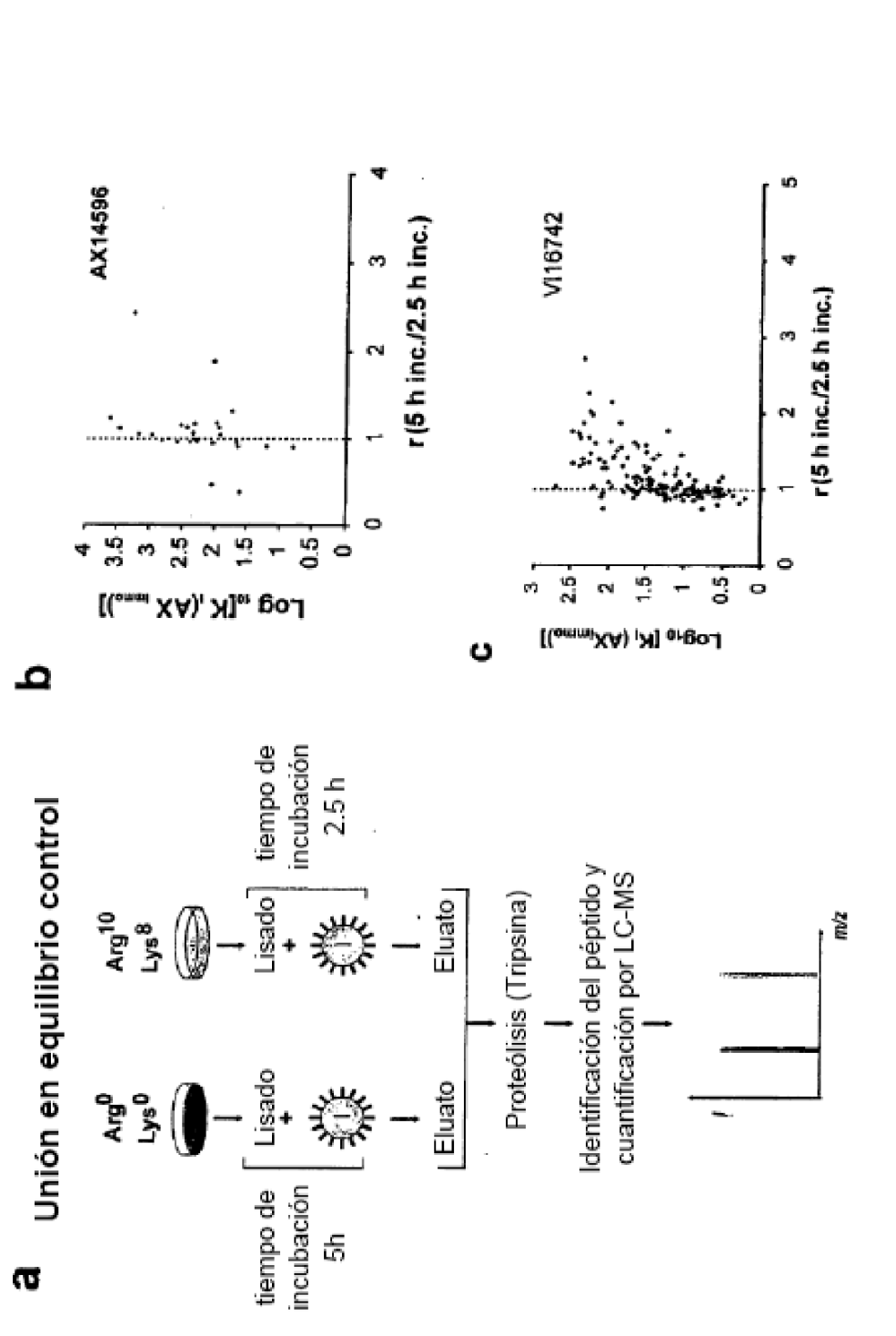


Figura 8

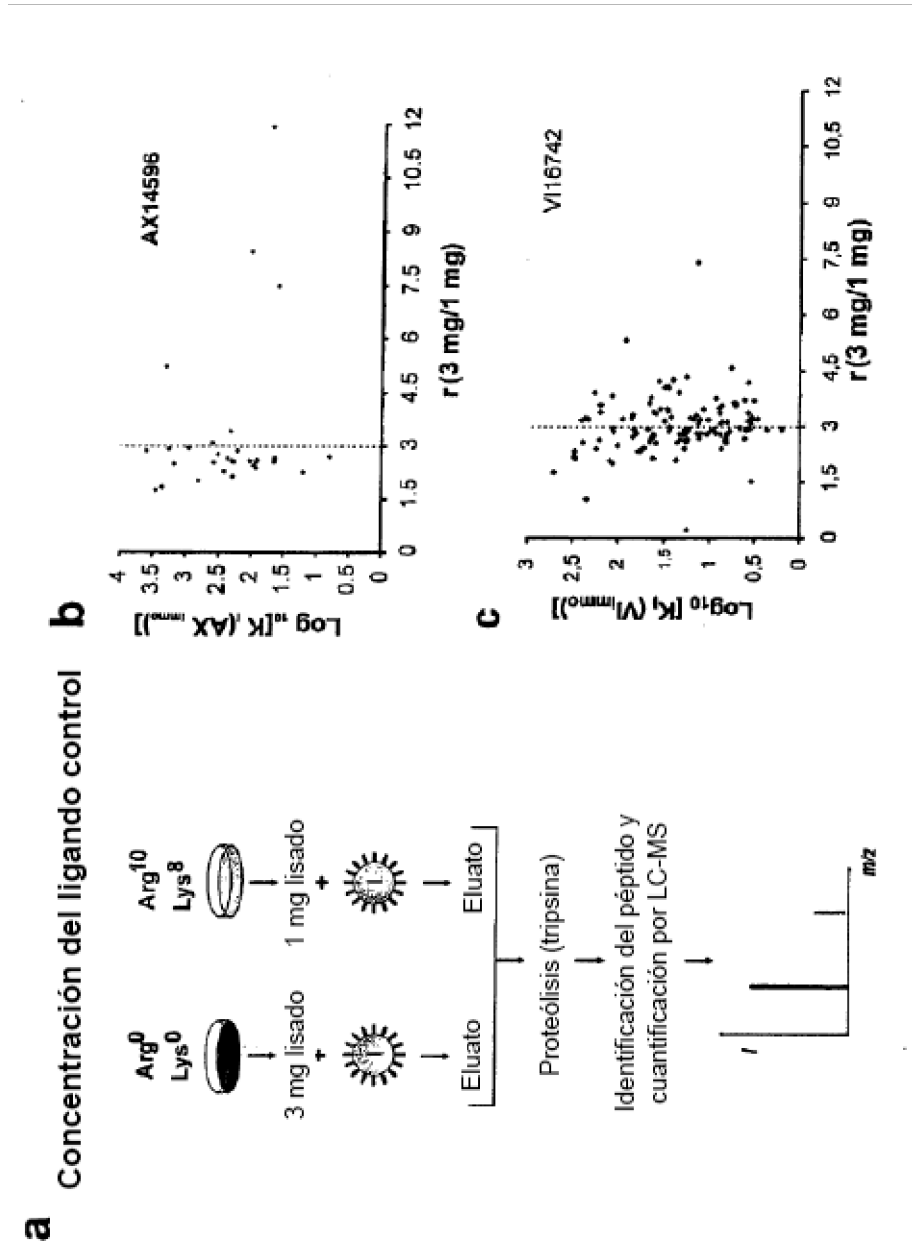


Figura 9

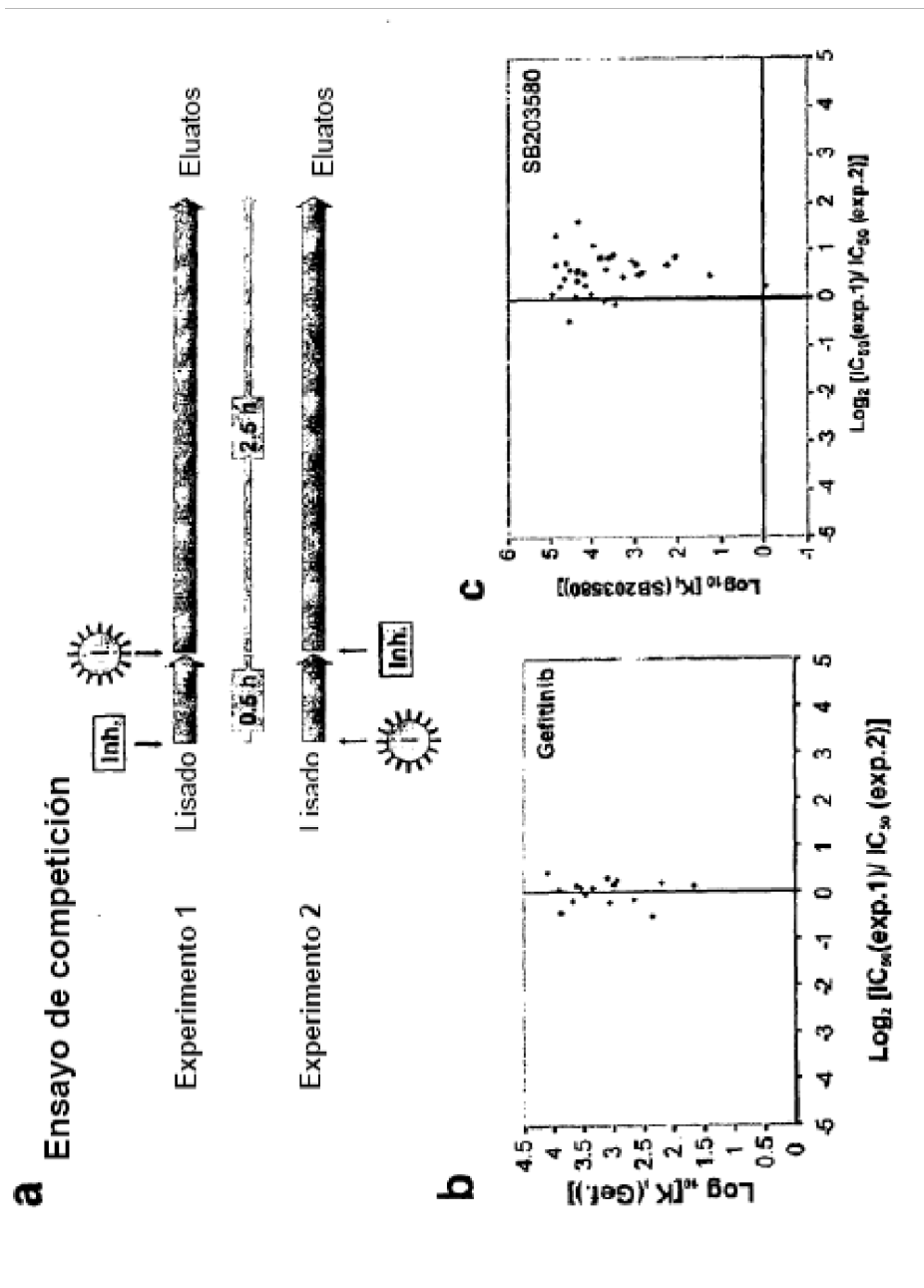
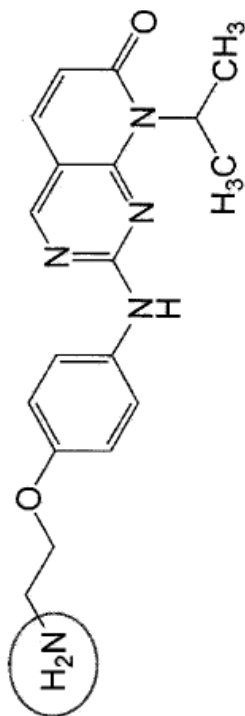


Figura 10

a



b

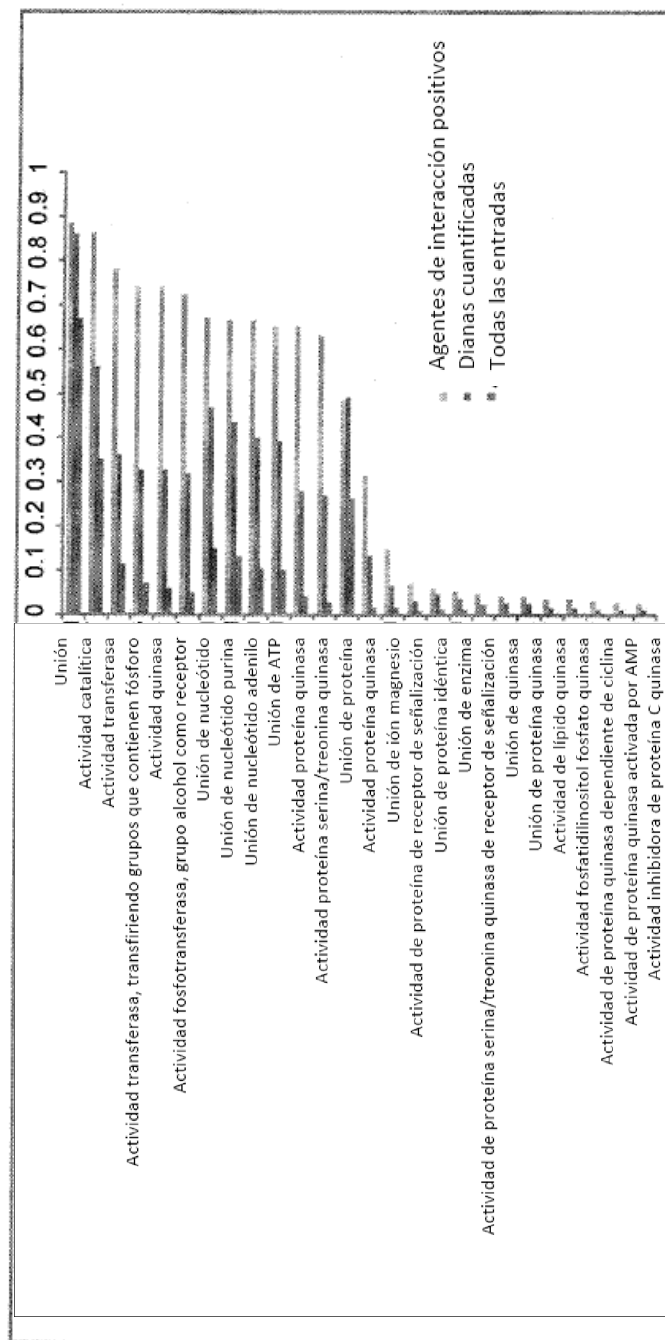


Figura 11

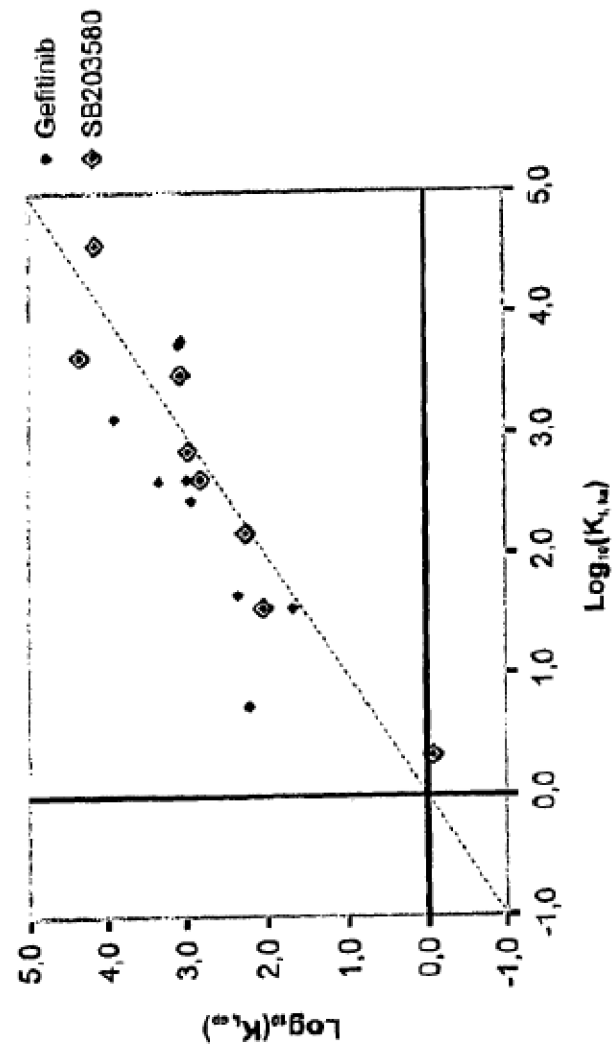


Figura 13

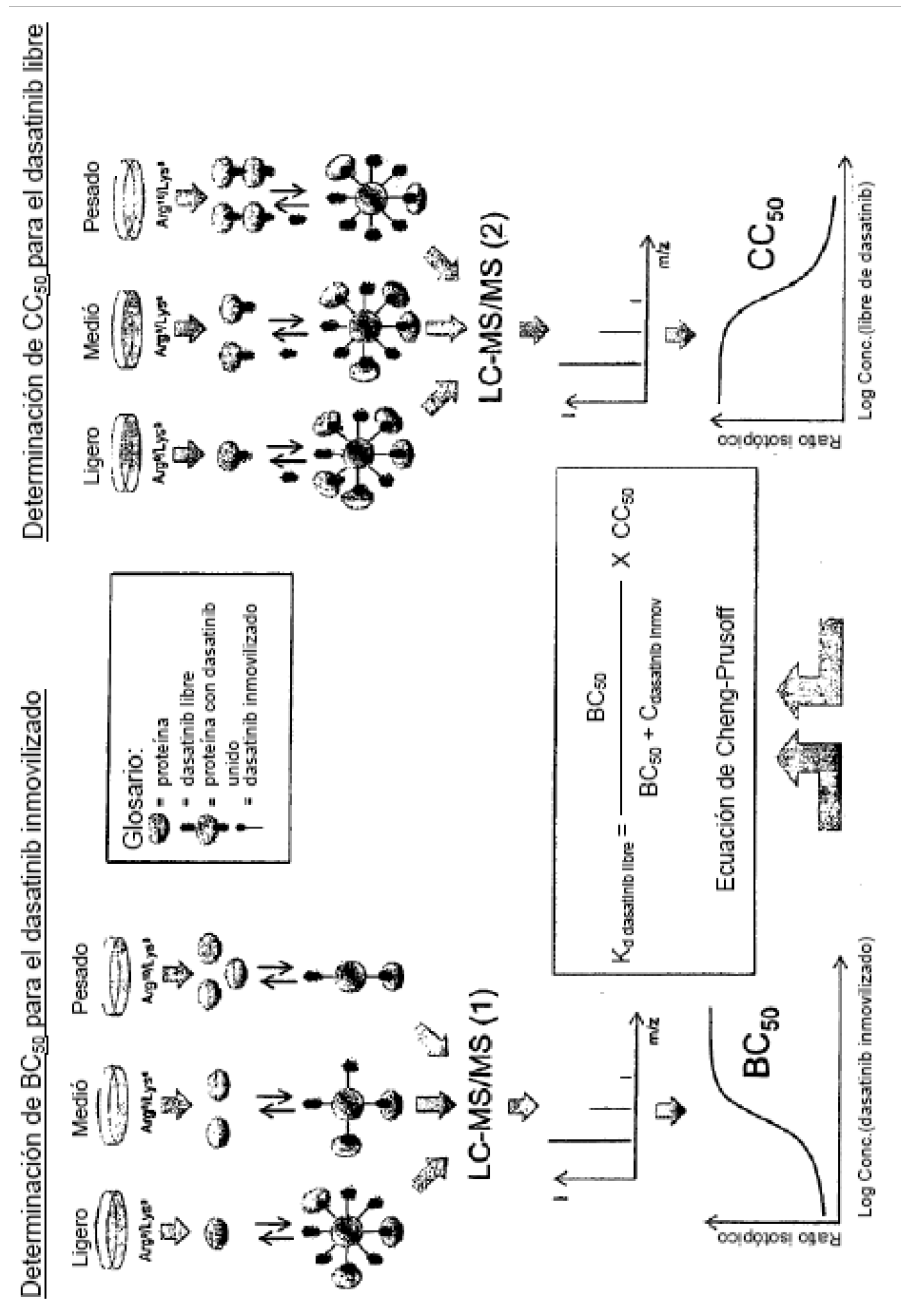


Figura 14

	K _d libre [μM]
Proteína tirosina quinasa proto-oncogén ABL1 (ABL1)	0.0016
Precursor del receptor 4 de tipo B de efrina (EPHB4)	0.0021
Proteína tirosina quinasa ABL2 (ABL2)	0.0028
Proteína tirosina quinasa Lyn (LYN)	0.0060
Proteína tirosina quinasa FRK (FRK)	0.0064
Proteína tirosina quinasa proto-oncogén Src (SRC)	0.0064
Proteína serina/treonina quinasa 2 que interacciona con receptor (RIPK2)	0.0076
Proteína tirosina quinasa proto-oncogén Yes (YES1)	0.0080
Proteína tirosina quinasa CSK (CSK)	0.0088
Quinasa 1 de CDC42 activada (TNK2)	0.0089
Precursor del receptor del factor de crecimiento de células de mastocito/madre (KIT)	0.0118
Proteína quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógeno (MAP3K4)	0.0128
Miembro 1 de la familia del receptor dominio discoidina (DDR1)	0.0135
Proteína tirosina quinasa BTK (BTK)	0.0174
Proteína tirosina quinasa Tec (TEC)	0.0184
Proteína serina/treonina quinasa QSK (QSK)	0.0225
Quinasa asociada a ciclina G (GAK)	0.0353
Quinasa 2 similar a proteína serina/treonina quinasa SNF1 (SNF1LK2)	0.1008
Proteína quinasa quinasa quinasa 5 activada por mitógeno (MAP4K5)	0.1347
Proteína quinasa 14 activada por mitógeno (MAPK14)	0.1534
Proteína quinasa quinasa quinasa MLT activada por mitógeno (MLTK)	0.1897
Miosina quinasa 3 de cadena ligera putativa (MYLK3)	0.1979
Proteína 1 supresora de Ras (RSU1)	0.2414
Quinasa inhibidora de cdc2 específica de tirosina y treonina asociada a membrana (PKMYT1)	0.2445
Proteína quinasa unida a membrana (ILK)	0.2551
Proteína 1 que contiene un dominio similar a un antígeno celular de senescencia y LIM (LIMS1)	0.2562
Proteína PARVB no caracterizada (PARVB)	0.2966
Quinasa 2 con dominio LIM (LIMK2)	0.4186
Proteína adaptadora relacionada con STE20 (STRAD)	0.5029
Diifina sintasa (DPH5)	0.6861
Precursor del receptor de activina tipo I (ACVR1)	1.2020
Proteína no caracterizada NUDT5 (NUDT5)	1.3054
Precursor de la amidofosforibosiltransferasa (PPAT)	1.5677
Adenosina quinasa (ADK)	2.1242
Subunidad de la proteína nuclear de unión al cap (NCBP1)	9.1232

Figura 14: Tabla de proteínas diana del dasatinib determinadas determinada a partir de extractos de células K562 y sus correspondientes valores de K_d.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5324633 A [0006]
- US 2007087348 A1 [0006]
- WO 0171732 A [0047]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- **FABIAN, M.A. et al.** *Nat. Biotechnol.*, 2005, vol. 23, 329-36 [0004] [0008]
- **DAVIES, S.P. et al.** *Biochem. J.*, 2000, vol. 351, 95-105 [0004]
- **GODL et al.** *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*, 23 December 2003, vol. 100 (26), 15434-9 [0006]
- **ANNIS DA et al.** *J Am Chem Soc.*, 01 December 2004, vol. 126 (47), 15495-503 [0006]
- **VALSASINA B et al.** give an overview on some examples of kinase selectivity profiling by inhibitor affinity chromatography. *Expert Rev Proteomics*, October 2004, vol. 1 (3), 303-15 [0006]
- **ANNIS DA et al.** *Anal Chem.*, 15 June 2007, vol. 79 (12), 4538-42 [0006]
- **C.R. LOWE.** *Eur. J. Biochem.*, 1974, vol. 42, 1-6 [0007]
- **DAUB, H. et al.** *Assay Drug Dev. Technol.*, 2004, vol. 2, 215-24 [0008]
- **GODL, K. et al.** *PNAS U.S.A.*, 2003, vol. 100, 15434-9 [0008]
- **BREHMER, D. et al.** *Cancer Res.*, vol. 65, 379-82 [0008]
- **DAUB, H.** *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, vol. 1754, 183-90 [0008]
- **BANTSCHOFF, M. et al.** Quantitative chemical proteomics reveals mechanisms of action of clinical ABL kinase inhibitors. *Nat Biotechnol*, 2007, vol. 25, 1035-1044 [0032]
- **SUBRAMANIAN A.** Immunoaffinity chromatography. *Mol. Biotechnol.*, 2002, vol. 20 (1), 41-47 [0083]
- **SHEVCHENKO et al.** *Analytical Chemistry*, 1996, vol. 68, 850-858 [0091]
- **MANN et al.** Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, vol. 70, 437-473 [0091]
- **HO Y et al.** Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 10 January 2002, vol. 415 (6868), 180-3 [0094]
- **GU S et al.** Precise peptide sequencing and protein quantification in the human proteome through in vivo lysine-specific mass tagging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, January 2003, vol. 14 (1), 1-7 [0094]
- **WILLIAMS C ; ADDONA TA.** The integration of SPR biosensors with mass spectrometry: possible applications for proteome analysis. *Trends Biotechnol.*, February 2000, vol. 18 (2), 45-8 [0094]
- **TERPE K.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, January 2003, vol. 60 (5), 523-33 [0095]
- **ABDELRAHEIM, S.R. ; SPILLER, D.G. ; MCLENAN, A.G.** Mammalian NADH diphosphatases of the Nudix family: cloning and characterization of the human peroxisomal NUDT12 protein. *Biochem J*, 2003, vol. 374, 329-335 [0107]
- **RAMOTAR, D. ; WANG, H.** Protective mechanisms against the antitumor agent bleomycin: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 2003, vol. 43, 213-224 [0107]
- **BANTSCHOFF, M. et al.** *Nat. Biotechnol.*, 2007, vol. 25, 1035-1044 [0109]
- **MOLONEY, G.P. et al.** A novel series of 2,5-substituted tryptamine derivatives as vascular 5HT1B/1D receptor antagonists. *J Med Chem*, 1997, vol. 40, 2347-62 [0119]
- **BARVIAN, M. et al.** Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J Med Chem*, 2000, vol. 43, 4606-16 [0119]
- **BREHMER, D. et al.** Cellular targets of gefitinib. *Cancer Res*, 2005, vol. 65, 379-382 [0119]
- **WISSING, J. et al.** Proteomics analysis of protein kinases by target class-selective prefractionation and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2007, vol. 6, 537-547 [0119]
- **SHEVCHENKO, A. et al.** *Nat. Protoc.*, 2006, vol. 1, 2856-60 [0125]
- **RAPPSILBER, J. et al.** *Nat. Protoc.*, 2007, vol. 2, 1896-906 [0125]
- **OLSEN, J.V. et al.** *Cell*, 2006, vol. 127, 635-48 [0125] [0128]
- **SCHROEDER, M.J. et al.** *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76, 3590-8 [0128]
- **OLSEN, J.V. et al.** *Mol. Cell Proteomics*, 2005, vol. 4, 2010-21 [0128]
- **ELIAS et al.** *Nat. Methods*, 2005, vol. 2, 667-75 [0129]

- **GRAUMANN, J. et al.** SILAC-labeling and proteome quantitation of mouse embryonic stem cells to a depth of 5111 proteins. *Mol Cell Proteomics*, 2007 [0132]
- **COX, J. ; MANN, M.** Is proteomics the new genomics?. *Cell*, 2007, vol. 130, 395-398 [0132]
- **GODL, K. et al.** An efficient proteomics method to identify the cellular targets of protein kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, vol. 100, 15434-15439 [0138]
- **HIBI, M. ; LIN, A. ; SMEAL, T. ; MINDEN, A. ; KARIN, M.** Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, 1993, vol. 7, 2135-2148 [0138]
- **BLENCKE, S. ; ULLRICH, A. ; DAUB, H.** Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 15435-15440 [0138]
- **KNIGHT, Z.A. ; SHOKAT, K.M.** Features of selective kinase inhibitors. *Chem Biol*, 2005, vol. 12, 621-637 [0138]