

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 400**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014** **E 14161897 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017** **EP 2924125**

54 Título: **Método de predicción de la respuesta tumoral a inhibidores de la metilación del ADN y regímenes terapéuticos alternativos para superar la resistencia**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2017

73 Titular/es:

PALACKY UNIVERSITY, OLOMOUC (100.0%)
Krizkovskeho 8
77147 Olomouc, CZ

72 Inventor/es:

AGRAWAL, KHUSHBOO;
DZUBAK, PETR;
HAJDUCH, MARIAN y
FRYDRYCH, IVO

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 638 400 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).

**MÉTODO DE PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA TUMORAL A INHIBIDORES DE LA METILACIÓN DEL ADN Y
REGÍMENES TERAPÉUTICOS ALTERNATIVOS PARA SUPERAR LA RESISTENCIA**

DESCRIPCIÓN

5

Campo de la técnica

La invención se refiere a un método para predecir la respuesta tumoral (es decir, sensible o resistente) hacia inhibidores de la metilación del ADN así como proporciona regímenes terapéuticos alternativos para superar la resistencia.

10

Antecedentes de la técnica

La resistencia al tratamiento quimioterápico es uno de los principales impedimentos que impiden la terapia contra el cáncer satisfactoria (Gottesman M.M. *et al.*, Nature Reviews Cancer 2002; 2, 48-58). Aunque la investigación ha revelado las principales firmas moleculares de la resistencia a la quimioterapia, incluyendo la inactivación intracelular del fármaco (Garattini S. *et al.*, European Journal of Cancer 2007; 43, 271-82), defectos en la reparación de apareamientos erróneos del ADN (Fink D. *et al.*, Clinical Cancer Research 1998; 4, 1-6), evasión de la apoptosis (Hanahan D. *et al.*, Cell 2000; 100, 57-70), transportadores de membrana (Huang Y. *et al.*, Cancer Research 2004; 64, 4294-301) y muchos más, el fracaso de la quimioterapia contra el cáncer sigue sin resolverse frecuentemente. Además, un mecanismo de resistencia farmacológica particular definido en sistemas de cultivo celular y modelos animales no se correlaciona necesariamente con la patología molecular individual en la práctica clínica (Cimoli G. *et al.*, Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1705, 103-20). Esto ha subrayado la importancia fundamental de investigar las dianas adicionales para sensibilizar a los pacientes con cáncer, resistentes a un fármaco particular, y adaptar un régimen terapéutico alternativo para los pacientes individuales. Actualmente, la epigenética ha surgido como uno de los campos más prometedores que expanden los límites de la oncología y la metilación aberrante del ADN sigue siendo el rasgo distintivo sistemático debido a su frecuente implicación en todos los tipos de cáncer (Rodríguez-Paredes M. *et al.*, Nature Medicine 2011; 17, 330-39). Análogos de citosina, 5-azacitidina (azacitidina) y 2'-desoxi-5-azacitidina (decitabina) son actualmente unos de los fármacos epigenéticos más eficaces (Stresemann C. *et al.*, International Journal of Cancer 2008; 123, 8-13), que funcionan inhibiendo la expresión de ADN metiltransferasas *de novo* y han mostrado una potencia sustancial en la reactivación de genes supresores de tumores silenciados por la metilación aberrante del ADN (Karahoca M. *et al.*, Clinical Epigenetics 2013; 5, 3). Los inhibidores de ADN metiltransferasa prototípicos, azacitidina y decitabina, son unos de los pocos fármacos a los que responden pacientes que padecen síndromes mielodisplásicos (MDS) y leucemia mieloide aguda (AML), y los ha aprobado la Food And Drug Administration (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para el tratamiento de MDS (Saba H.I. *et al.*, Therapeutics and Clinical Risk Management 2007; 3, 807-17). Aparte de ser terapias establecidas para tumores malignos mieloides, parecen prometedoras en la erradicación de tumores sólidos durante ensayos clínicos tempranos (Cowan L.A. *et al.*, Epigenomics 2010; 2, 71-86). Sin embargo, como otros fármacos anticancerígenos, la resistencia a estos agentes hipometilantes es la principal barrera, revirtiendo la terapia epigenética eficaz. La mayoría de los pacientes no responden a la terapia y experimentan resistencia primaria mientras que los que responden inicialmente adquieren resistencia secundaria y sucumben a la enfermedad, a pesar de la terapia continuada (Prébet T. *et al.*, Journal of Clinical Oncology 2011; 29, 3322-7). Los mecanismos moleculares que dilatan la causa de la resistencia a estos fármacos *in vitro* son diversos, incluyendo un flujo de entrada insuficiente del fármaco por los transportadores de membrana, deficiencia de la enzima desoxicitidina cinasa requerida para la activación del fármaco o desaminación por citidina desaminasa que conduce a un aumento del metabolismo del fármaco, pero no pueden explicar la resistencia adquirida en pacientes. Además, también se ha implementado que la resistencia secundaria a decitabina es probable que sea independiente de la metilación del ADN y la resistencia se desarrolla a pesar de una desmetilación persistente (Qin T. *et al.*, PLOS ONE 2011; 6, e23372). Además, no puede negarse el hecho de que la reexpresión de genes supresores de tumores silenciados epigenéticamente tras el tratamiento con decitabina es transitoria (Kagey J.D. *et al.*, Molecular Cancer Research 2010; 8, 1048-59). La retirada de la decitabina da como resultado finalmente resilenciamiento génico que conduce a resistencia mientras que la reexpresión génica sostenida está en concordancia con la respuesta clínica, apoyando el papel del resilenciamiento génico en el desarrollo de resistencia farmacológica (Hesson L.B. *et al.*, PLOS Genetics 2013; 9, e1003636). Si el foco se pone en el resilenciamiento génico como requisito previo para la resistencia, destaca el dogma central de la epigenética que expresa que los mecanismos de silenciamiento génico (hipermetilación del ADN, mutaciones en complejos de remodelación de la cromatina y múltiples modificaciones de histonas postraduccionales) no están aislados entre sí sino que están interconectados (Grant S. *et al.*, Clinical Cancer Research 2009; 15, 7111-3). En este contexto, los bromodominios (BRD), módulos efectores de cromatina que reconocen y se unen a motivos de ϵ -N-acetil-lisina, han surgido rápidamente como nuevas y fascinantes dianas en la búsqueda de progreso clínico en cáncer (Muller S. *et al.*, Expert Reviews in Molecular Medicine). El papel de genes de bromodominio múltiples en la restricción de la propagación del silenciamiento heterocromático se ha explorado en el pasado (Jambunathan N. *et al.*, Genetics 2005; 171, 913-22). Además, las proteínas de bromodominios desempeñan un papel crítico en la activación génica mediante el reclutamiento de los factores necesarios para la transcripción (Josling G.A. *et al.*, Genes 2012; 3, 320-43). La familia de BRD humana comprende 47 genes y/o proteínas que contienen bromodominios incluyendo la familia de bromodominio y dominio terminal extra (BET) compuesta por BRD2, BRD3, BRD4 y BRDT (Puissant A. *et al.*, Cancer Discovery 2012; 3, 1-16). Braun

65

et al. (Blood 2008; 118, 3824-3831), dan a conocer marcadores de expresión de respuesta a decitabina, un tipo bien conocido de inhibidor de la metilación del ADN, en leucemia mielomonocítica crónica avanzada. La presente invención expone tales genes y/o proteínas que contienen bromodominios codificadas por el gen, cuya expresión se regulaba de manera diferencial durante el desarrollo de la resistencia, y cuya selección como diana puede sensibilizar a los pacientes que padecen resistencia hacia inhibidores de la metilación del ADN. Por tanto, la presente invención proporciona un método para determinar la respuesta de los pacientes (es decir, sensible o resistente) hacia inhibidores de la metilación del ADN y también proporciona los regímenes terapéuticos alternativos para resolver la resistencia.

10 **Divulgación de la invención**

La primera realización de la invención es un método para predecir la sensibilidad de un paciente que padece una enfermedad cancerosa a una terapia con inhibidor de la metilación del ADN, que comprende determinar *in vitro* en las células cancerosas tomadas del paciente y comparar con valores para el tipo parental de las células

15 - el nivel de expresión del gen que contiene bromodominios ASH1L, en el que el cambio en la expresión que determina resistencia es un aumento, y/o

20 - las mutaciones que implican el cambio no sinónimo en la secuencia de aminoácidos de la proteína que contiene bromodominios ASH1L:

	Cambio de aminoácido que determina resistencia		Mutación en líneas celulares parental frente a resistente	
	Posición	Referencia	Parental	Resistente
ASH1L	1429	Alanina	Alanina	Valina

25 y posteriormente determinar la resistencia o sensibilidad del paciente hacia dicho tratamiento basándose en la información proporcionada anteriormente.

En una realización preferida, el método comprende además determinar *in vitro* en células cancerosas tomadas del paciente y comparar con valores para el tipo parental de las células

30 - el nivel de expresión de al menos un gen que contiene bromodominios adicional seleccionado del grupo que comprende:

Gen	Cambio en la expresión que determina resistencia
ATAD2	disminución
BAZ1B	disminución
BAZ2A	aumento
BAZ2B	disminución
BRD1	disminución
BRD3	disminución
BRD7	disminución
BRD8	disminución
BRWD1	aumento
CECR2	aumento
CREBBP	aumento
EP300	aumento
KAT2A	aumento
KAT2B	aumento
KMT2A	aumento
SMARCA2	aumento
SP100	aumento
SP110	aumento
TRIM66	disminución
ZMYND8	disminución
ZMYND11	disminución

y/o

35 - el nivel de expresión de al menos una proteína que contiene bromodominios seleccionada del grupo que comprende:

Proteína	Cambio en la expresión que determina
	resistencia
familia de ATPasa, proteína 2 que contiene dominio AAA	disminución
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 1A	disminución
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 1B	aumento
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 2A	disminución
factor de transcripción de dedo PHD de bromodominio	aumento
proteína 2 que contiene bromodominio	disminución
proteína 8 que contiene bromodominio	aumento
región cromosómica de síndrome de ojo de gato, proteína 2 candidata	aumento
proteína de unión a CREB	disminución
metiltransferasa 2A específica de lisina (K)	aumento
polibromo 1	aumento
proteína de interacción con dominio de homología a pleckstrina	aumento
Proteína relacionada con SWI/SNF, asociada a la matriz, regulador de la cromatina dependiente de actina, subfamilia a, miembro 4	aumento
antígeno nuclear SP100	aumento
TAF1 ARN polimerasa II, factor asociado a proteína de unión a caja TATA (TBP), 250 kDa	aumento
proteína 28 que contiene motivo tripartito	disminución
proteína 33 que contiene motivo tripartito	aumento

y/o

- las mutaciones que implican el cambio no sinónimo en la secuencia de aminoácidos de al menos una proteína que contiene bromodominios adicional seleccionada del grupo que comprende:

5

	Cambio de aminoácido que determina resistencia		Mutación en líneas celulares parentales frente a resistentes	
	Posición	Referencia	Parental	Resistente
ATAD2	365	Serina	Serina	Fenilalanina
ATAD2B	207	Glutamina	Arginina	Glutamina
BAZ2A	1	Metionina	Isoleucina	Metionina
BAZ2A	650	Glicina	Glicina	Alanina
KAT2A	781	Arginina	Arginina	Prolina
SMARCA2	855	Arginina	Glutamina	Arginina
TRIM24	478	Prolina	Leucina	Prolina
TRIM24	512	Prolina	Leucina	Prolina
TRIM33	286	Leucina	Leucina	Prolina
TRIM66	630	Leucina	Valina	Leucina
TRIM66	324	Histidina	Arginina	Histidina
TRIM66	466	Histidina	Histidina	Arginina

10

El cambio en el nivel de expresión (regulación por incremento o regulación por disminución) de los genes y/o las proteínas codificadas por los genes, enumerados en la tabla relevante, se observó repetidamente en varias líneas celulares resistentes a fármacos en comparación con sus homólogos sensibles a fármacos genéticamente idénticos, y es por tanto el indicador de resistencia hacia el inhibidor de la metilación del ADN, 2'-desoxi-5-azacitidina (DAC). Preferiblemente, se determina el nivel de expresión de una combinación de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez genes que contienen bromodominios y opcionalmente también el nivel de expresión de una combinación de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez proteínas que contienen bromodominios. Lo más preferiblemente, se determina el nivel de expresión de todos los genes que contienen bromodominios enumerados y opcionalmente también el nivel de expresión de todas las proteínas que contienen bromodominios enumeradas.

15

20

Las mutaciones en genes que contienen bromodominios en una posición de referencia dada se observaron repetidamente entre las líneas celulares resistentes a fármacos y sus homólogos sensibles a fármacos genéticamente idénticos en comparación con el genoma humano de referencia, y es por tanto el indicador de resistencia hacia el inhibidor de la metilación del ADN, DAC. Preferiblemente, se determinan las mutaciones en una posición de referencia dada en una combinación de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez genes que contienen bromodominios. Lo más preferiblemente, se determinan las mutaciones en todos los genes que contienen bromodominios enumerados.

25

Se determinó repetidamente el aumento en los valores de CI₅₀ de los inhibidores epigenéticos sometidos a prueba

en varias líneas celulares resistentes a fármacos en comparación con sus homólogos sensibles a fármacos genéticamente idénticos, lo que indica la resistencia cruzada de las células resistentes a DAC a otros inhibidores epigenéticos. Por tanto, los datos de expresión de genes y proteínas mencionados el presente descubrimiento también pueden aplicarse para predecir la sensibilidad y/o resistencia hacia otros fármacos epigenéticos con un modo de acción similar a 2'-desoxi-5-azacitidina.

El método de determinación de la resistencia y la terapia de combinación son particularmente útiles en cánceres seleccionados de carcinomas, sarcomas, melanomas, linfomas y leucemia.

10 Ejemplos de realización de la invención

Cultivo celular/desarrollo de líneas celulares resistentes

Se usó la línea celular derivada del paciente que padece cáncer colorrectal humano, HCT116 (Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, EE.UU.) para estudiar el mecanismo de resistencia hacia el inhibidor de la metilación del ADN, 2'-desoxi-5-azacitidina. Se mantuvo la línea celular en medio 5A de McCoy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) complementado con suero bovino fetal al 10% (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Alemania), penicilina 100 U/ml (Biotika, Slovenská L'upča, República de Eslovaquia), estreptomycin 50 µg/ml y L-glutamina 3 mM (Sigma-Aldrich) a 37°C y el 5% de CO₂.

Se desarrollaron las líneas celulares resistentes usando dos métodos. Para el fin, se dividieron células HCT116 de pase temprano y se sembraron en dos placas de Petri. Las células en la placa de Petri A se trataron inicialmente con una concentración de 1x CI₅₀ del fármaco (0,28 µM) que se aumentó gradualmente con la adaptación de resistencia hasta 10x CI₅₀ en pases posteriores. Las células en la placa de Petri B se expusieron directamente a una concentración de 5x CI₅₀ del fármaco que se dobló adicionalmente hasta 10x CI₅₀. Tras la exposición a largo plazo de las células a una dosis citotóxica del fármaco, se determinó que la población en general era resistente. La clonación de la población de células resistentes dio como resultado seis líneas celulares resistentes, R1.1, R1.2, R1.3, R1.4 (aisladas de la placa de Petri A) y R2.1, R2.2 (aisladas de la placa de Petri B).

Se confirmó la resistencia mediante el ensayo de supervivencia celular basado en MTT y se calculó el índice de resistencia como el aumento en veces en la CI₅₀ de las líneas celulares resistentes en comparación con el control sin tratar. Todas las líneas celulares resistentes eran > 100 veces resistentes a DAC.

Transcriptómica basada en secuenciación del ARN (Seq.-ARN)

La secuenciación del ARN (Seq.-ARN) utilizando plataformas de secuenciación de alto rendimiento ha surgido como el método poderoso para descubrir, obtener el perfil y cuantificar el transcriptoma facilitando mediciones relativamente no sesgadas de expresiones de genes y transcritos, la capacidad de medir expresiones específicas de exón y alelo y de detectar la transcripción de exones no anotados que conducen a la identificación de transcritos poco comunes y novedosos (Pickrell J.K. *et al.*, Nature 2010; 464, 768-72).

Preparación de muestras/construcción de una biblioteca de ADNc:

Se hicieron crecer líneas celulares parentales HCT116 y cada una de las seis líneas celulares resistentes en placas de Petri con una cobertura mayor del 80%. Se homogeneizaron las células usando 1 ml de reactivo TRI (trizol) por 10 cm² del cultivo de monocapa y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína, tras lo cual se transfirieron los homogenizados a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se extrajo el ARN total mediante el método de extracción orgánica según el protocolo del fabricante (Ambion RiboPure Kit, Life Technologies, Carlsbad, CA). Se analizó la integridad de las muestras de ARN obtenidas (kit Agilent RNA 6000 Nano, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) usando el bioanalizador Agilent 2100.

Se usaron entonces 0,1-4 µg del ARN total y se construyó la biblioteca de ADNc según el protocolo del fabricante (kit de prep. de muestra de ARN TruSeq Stranded, Illumina, San Diego, CA). En resumen, se purificaron las moléculas de ARNm que contenían poli-A usando perlas magnéticas unidas a oligonucleótidos de poli-T en dos rondas de purificación que incluían fragmentación del ARN y cebado con hexámeros al azar. Entonces se transcribieron de manera inversa los fragmentos de ARN (transcriptasa inversa RevertAid H Minus, Thermo Scientific, Waltham, MA) para dar ADNc de primera hebra seguido por síntesis de ADNc de segunda hebra. Se complementó la síntesis de ADNc con un control de "reparación de extremos" a -20°C. Entonces se añadió un único nucleótido "A" a los extremos 3' de los fragmentos romos seguido por la ligación de múltiples adaptadores de indexación. Los fragmentos de ADN con moléculas adaptadoras en ambos extremos se enriquecieron entonces selectivamente y se amplificaron por PCR.

Se validó la biblioteca de ADNc así preparada y se cuantificó (kit de ADN de alta sensibilidad Agilent, Agilent Technologies) usando el bioanalizador Agilent 2100. Finalmente, se agruparon entre sí las muestras con diferentes índices para la secuenciación.

Secuenciación del ARN, alineación y determinación de variantes:

Se secuenció el transcriptoma mediante secuenciación de firmas masivamente paralela (MPSS) usando el sistema de secuenciación de rendimiento ultraalto de Illumina, HiSeq 2500.

Las lecturas generadas a partir del experimento de secuenciación de ARN se alinearon con un genoma de referencia humano anotado (HG₁₉) usando Tophat 2 (Trapnell C. *et al.*, Bioinformatics 2009; 25, 1105-11) y se contaron las que se alineaban con exones, genes y uniones de corte y empalme. Se fijó la tolerancia para permitir el máximo de dos apareamientos erróneos durante una alineación y no se contaron las lecturas que se alineaban con múltiples ubicaciones genómicas.

Se determinaron variantes (cSNP, indels y uniones de corte y empalme) tras la alineación mediante SAMtools (Li H. *et al.*, Bioinformatics 2009; 25, 2078-79) y se anotaron mediante ANNOVAR (Wang K. *et al.*, Nucleic Acids Research 2010; 38, e164).

Para la cuantificación de la expresión de nivel de transcritos y genes, se usó el paquete HTSeq (Python) y se notificaron expresiones diferenciales tras la normalización de los datos y la evaluación estadística usando el paquete DESeq (R library). Se determinó la significación estadística mediante la prueba binomial y se fijó el umbral para la significación a 0,01.

Proteómica basada en espectrometría de masas

Mientras que los estudios de transcriptómica proporcionan una perspectiva de los papeles de la expresión génica y de ARN, es en última instancia el cambio en el nivel de expresiones de proteínas lo que afecta a las funciones biológicas. El marcaje con isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular (SILAC) acoplado con espectrometría de masas ha evolucionado como una herramienta inestimable en la identificación y el desarrollo de biomarcadores novedosos facilitando la cuantificación de niveles de proteínas diferenciales en estados normal y fisiopatológico (Mann M., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006; 7, 952-58).

SILAC/Preparación de lisados:

Se cultivó la línea celular parental, HCT116, en medio SILAC (Thermo Scientific) sustituido con Lys-¹³C₆ y Arg-¹³C₆ pesados y suero bovino fetal dializado (Sigma-Aldrich) durante aproximadamente 8 duplicaciones hasta alcanzar el marcaje completo. Entonces se mezcló la línea celular parental marcada con cada una de las líneas celulares resistentes no marcadas en una razón 1:1. Se lavó la mezcla celular así preparada dos veces con 1x PBS enfriado con hielo con inhibidores [inhibidores de fosfatasa (pírofosfato de sodio 5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 5 mM), inhibidores de proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, cóctel inhibidor de proteasas; Sigma-Aldrich)] seguido por un lavado con 1x PBS sin inhibidores tras lo cual se lisaron las células usando 200 μ l de tampón de lisis SILAC enfriado con hielo [Tris-HCl 20 mM, urea 7 M, DTT 10 mM (ditiotretol), Triton X-100 al 1%, SDS al 0,5%] por 2×10^7 células. Entonces se sonicaron los lisados usando un sonicador digital Branson y se clarificaron mediante centrifugación a 14.000 rpm durante 10 min y se almacenaron los sobrenadantes clarificados a -80°C.

Fraccionamiento/digestión enzimática en gel:

Se fraccionaron lisados celulares (100 μ l) mediante el peso molecular en gel de LDS-Tris-glicina al 12% a través de una matriz de gel cilíndrica mediante electroforesis en gel de elución continua (Mini Prep Cell, Bio-Rad, Hercules, CA) a potencia constante de 1 W durante 3-4 horas. Tras la electroforesis, se extrajo el gel del tubo y se fijó (el 10% de ácido acético, el 35% de etanol) seguido por aclarado con H₂O Milli-Q. Usando un bisturí limpio, se cortó entonces el trozo de gel de 90 mm en 20 rodajas (~4,5 mm cada una) que se cortaron adicionalmente en trozos pequeños (~1 mm³) y se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1,5 ml.

Entonces se deshidrataron los trozos de gel con ACN (acetoniitrilo) mediante sonicación durante 5 min seguido por reducción con tris-(2-carboxietil)fosfina 50 mM a 90°C durante 10 min. Se deshidrató de nuevo el gel reducido seguido por alquilación con IAA (yodoacetamida) 50 mM recién preparada durante 60 min en la oscuridad. Tras la alquilación, se deshidrató el gel dos veces con cambios de ACN y H₂O (para garantizar la eliminación completa de IAA) seguido por deshidratación con el 50% de ACN al final. Finalmente, se sometió el gel a digestión enzimática mediante incubación durante la noche a 37°C con tampón tripsina (Trypsin Gold, Promega, Madison, WI) preparado según el protocolo del fabricante.

Tras la digestión en el gel de las proteínas, se extrajeron las mezclas de péptidos mediante deshidratación del gel [TFA (ácido trifluoroacético) al 0,1%, el 80% de ACN] seguido por rehidratación (TFA al 0,1%) y deshidratación con el 50% de ACN al final. Entonces se concentró el tampón de extracción hasta la evaporación completa y se resuspendieron las mezclas de péptido (5 μ l del 80% de ACN, TFA al 0,1%) y se diluyeron (145 μ l de TFA al 0,1%). Entonces se cargaron 150 μ l de las muestras de péptido sobre la columna (MacroTrap, MICHROM Bioresources

Inc., Auburn, CA) y se desalaron (TFA al 0,1%) seguido por elución (TFA al 0,1%, el 80% de ACN). Tras la purificación, se evaporó completamente el tampón de elución y se resuspendieron los péptidos purificados en fase móvil A [el 5% de ACN, FA (ácido fórmico) al 0,1%] para el análisis por CL-EM.

5 CL-EM/EM:

Se cargaron 20 μ l de muestras de péptido en fase móvil A sobre la columna trampa (Acclaim PepMap100 C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m de d.i. x 2 cm, nanoViper, Thermo Scientific) en el sistema UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Scientific) para la preconcentración y desalación a la velocidad de flujo de 5 μ l/min. La columna trampa a su vez se conectó directamente con la columna de separación (PepMap C18, 3 μ m, 100 Å, 75 μ m de d.i. x 15 cm, Thermo Scientific) en EASY-Spray (Thermo Scientific) y se eluyeron los péptidos separados mediante cromatografía de fase inversa con un gradiente lineal de 100 min de desde el 5 hasta el 35% de fase móvil B (el 80% de ACN, FA al 0,1%) a la velocidad de flujo de 300 nl/min y 35°C de temperatura de columna. Tras el gradiente, se lavó la columna con fase móvil B y se reequilibró con fase móvil A. Para la adquisición de espectros de masa, se acopló la cromatografía de líquidos de alta resolución con un espectrómetro de masas Orbitrap Elite (Thermo Scientific) y se adquirieron los espectros de una manera dependiente de los datos con un interruptor automático entre los barridos de EM y EM/EM usando un método de los 20 mejores. Se adquirieron los espectros de EM usando el analizador Orbitrap con un intervalo de masas de 300-1700 Da y un valor objetivo de 10^6 iones mientras que se adquirieron los espectros de EM/EM usando un analizador de trampa de iones y un valor objetivo de 10^4 iones. Se realizó la fragmentación de péptidos usando el método CID y se fijó el umbral de selección de iones a 1000 cuentas.

Análisis de datos:

Se analizaron los archivos de EM sin procesar mediante MaxQuant versión 1.4.1.3 (Cox J. *et al.*, Nature Biotechnology 2008; 26, 1367-72) y se realizaron búsquedas con los espectros de EM/EM usando el motor de búsqueda Andromeda (Cox J. *et al.*, Journal of Proteome Research 2011; 10, 1794-1805) en la base de datos humana UniprotKB/Swiss-Prot (generada a partir de la versión 2013_09) que contenía secuencias directas e inversas. Se incluyó la base de datos adicional de 248 contaminantes comunes durante la búsqueda (Geiger T. *et al.*, Molecular & Cellular Proteomics 2012; 11, M111.014050). Se realizó la calibración de masas usando los resultados de la búsqueda inicial con una tolerancia de masas de precursor de 20 ppm, sin embargo, en la búsqueda de Andromeda principal, la masa de precursor y la masa de fragmento se fijó a la tolerancia de 7 ppm y 20 ppm respectivamente. La modificación fijada de carbamidometilcisteína y las modificaciones variables de oxidación de metionina y acetilación N-terminal se incluyeron para la búsqueda en la base de datos. Se usaron marcadores de SILAC, R6 y K6, para el análisis de los datos de SILAC. La búsqueda se basó en la regla de escisión enzimática de tripsina/P y se permitió un máximo de dos escisiones erróneas. La longitud de péptido mínima se fijó a seis aminoácidos y al menos un único péptido era indispensable para la identificación de proteínas. La tasa de falso descubrimiento (FDR) para la identificación de péptido y proteína se fijó a 0,01.

Entonces se realizó el análisis bioinformático con Perseus versión 1.4.1.3. Se realizaron filtraciones para erradicar las identificaciones de las bases de datos de la secuencia inversa y los contaminantes comunes y para excluir proteínas con < 3 valores válidos (sólo se consideraron péptidos cuantificados en tres mediciones). Se suministró la anotación categórica en forma de proceso biológico de ontología génica (GO), función molecular y componente celular. Para la cuantificación de la expresión diferencial, se transformaron los datos a log 2 y se normalizaron restando la mediana de cada columna. Se calculó el cambio en veces como la media de los tres valores y se determinó la significación calculando el valor de p con una corrección de las pruebas de hipótesis múltiples de Benjamini-Hochberg basada en el umbral de FDR de 0,05.

Resultados

Se realizaron los estudios de expresión de genes y proteínas al nivel de ARN y proteína respectivamente. Para los estudios de expresión génica, se usó secuenciación de firmas masivamente paralela (MPSS) y se mapearon las secuencias generadas a partir del experimento de Seq.-ARN en el genoma humano de referencia anotado (HG₁₉) seguido por cuantificación de las expresiones de genes y transcritos, mientras que para los estudios de expresión de proteína, se usó marcaje con isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular (SILAC) y se cuantificaron las expresiones de proteínas usando espectrometría de masas.

Para notificar las expresiones diferenciales, se comparó cada una de las líneas celulares resistentes a fármacos, HCT116-DAC (R1.1, R1.2, R1.3, R1.4 y R2.1, R2.2) con sus homólogos sensibles a fármacos genéticamente idénticos o la línea celular parental, HCT116.

Los valores se representan como cambios en veces. Valores positivos indican regulación por incremento y valores negativos indican regulación por disminución. Los datos se generan a partir de tres experimentos independientes y son significativos estadísticamente (valor de p <0,05).

ES 2 638 400 T3

Gen	Cambio en la expresión que determina resistencia	Cambio en veces promedio en líneas celulares resistentes a DAC					
		R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2
ASH1L	aumento						0,52
ATAD2	disminución					-0,67	-0,64
BAZ1B	disminución					-0,40	
BAZ2A	aumento			0,33	0,33		0,38
BAZ2B	disminución				-0,92		
BRD1	disminución	-0,48	-0,52				
BRD3	disminución		-0,37				
BRD7	disminución						-0,55
BRD8	disminución	-0,44	-0,35		-0,47	-0,67	-0,50
BRWD1	aumento	0,66					
CECR2	aumento						0,73
CREBBP	aumento			0,35	0,40		
EP300	aumento						0,35
KAT2A	aumento	0,37		0,47	0,40	0,43	
KAT2B	aumento						0,62
KMT2A	aumento		0,45				
SMARCA2	aumento	0,71	0,73	0,69	0,98	0,76	1,17
SP100	aumento	0,77	0,59		0,99	0,51	1,22
SP110	aumento	0,85	0,58		1,29		1,19
TRIM66	disminución			-0,60	-0,55		
ZMYND8	disminución					-0,50	-0,50
ZMYND11	disminución		-0,55			-0,43	

Proteína	Cambio en la expresión que determina resistencia	Cambio en veces promedio en líneas celulares resistentes a DAC					
		R1.1	R1.2	R1.3	R1.4	R2.1	R2.2
familia de ATPasa, proteína 2 que contiene dominio AAA	disminución	-0,10	-1,19	-0,33	-0,78	-0,22	-0,31
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 1A	disminución	-0,69	-0,58	-0,53	-0,68	-0,58	-0,54
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 1B	aumento	0,38	0,27	0,22	0,31	0,29	0,15
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 2A	disminución	-0,66		-0,34	-0,47	-0,16	-0,32
factor de transcripción de dedo PHD de bromodominio	aumento	0,07		-0,01	-0,09	0,05	
proteína 2 que contiene bromodominio	disminución	-0,70		-0,54	-0,32	-0,28	
proteína 8 que contiene bromodominio	aumento						1,78
región cromosómica de síndrome de ojo de gato, proteína 2 candidata	aumento	0,61	0,54	0,55	0,44	0,17	0,03
proteína de unión a CREB	disminución		-0,67	-0,38	-0,09	-0,14	
metiltransferasa 2A específica de lisina (K)	aumento		0,00			0,04	
polibromo 1	aumento	0,52		0,53	0,26	0,47	
proteína de interacción con dominio de homología a pleckstrina	aumento	0,52		0,31		-0,01	
Proteína relacionada con SWI/SNF, asociada a la matriz, regulador de la cromatina dependiente de actina, subfamilia a, miembro 4	aumento	0,58	0,55	0,42	0,43	0,31	0,34
antígeno nuclear SP100	aumento	-0,26		0,02	-0,16	0,11	1,09
TAF1 ARN polimerasa II, factor asociado a proteína de unión a caja TATA (TBP), 250 kDa	aumento		0,60		0,38	0,25	
proteína 28 que contiene motivo tripartito	disminución	-0,03	-0,33	-0,22	-0,20	-0,09	-0,24
proteína 33 que contiene motivo tripartito	aumento	0,27		0,23	0,12	0,29	0,95

Las mutaciones que implican cambios no sinónimos en la secuencia de aminoácidos se determinaron usando los datos generados a partir del experimento de Seq.-ARN, tras la etapa de alineación.

5 La validez de las mutaciones representadas en la tabla se determina mediante la alta calidad y cobertura de las lecturas (>100). Además, estas mutaciones se identificaron al menos en tres experimentos de secuenciación independientes.

Gen	Cambio de aminoácido que determina resistencia		Mutación en líneas celulares parental frente a resistente	
	Posición	Referencia	HCT116	HCT116-DAC
ASH1L	1429	Alanina	Alanina	Valina (R2.1)
ATAD2	365	Serina	Serina	Fenilalanina (R1.1, R1.2, R1.3)
ATAD2B	207	Glutamina	Arginina	Glutamina (R1.2)
BAZ2A	1	Metionina	Isoleucina	Metionina (R1.1, R1.2, R1.3, R1.4, R2.1)
BAZ2A	650	Glicina	Glicina	Alanina (R1.3)
KAT2A	781	Arginina	Arginina	Prolina (R2.1)
SMARCA2	855	Arginina	Glutamina	Arginina (R1.2)
TRIM24	478	Prolina	Leucina	Prolina (R2.1)
TRIM24	512	Prolina	Leucina	Prolina (R2.1)
TRIM33	286	Leucina	Leucina	Prolina (R2.2)
TRIM66	630	Leucina	Valina	Leucina (R1.2, R1.3, R1.4, R2.2)
TRIM66	324	Histidina	Arginina	Histidina (R1.2, R1.3)
TRIM66	466	Histidina	Histidina	Arginina (R1.4)

10 Aplicabilidad industrial

Los genes y/o las proteínas que contienen bromodominios dados a conocer en la presente invención pueden usarse como biomarcadores para predecir la respuesta clínica hacia la terapia epigenética que selecciona como diana la metilación aberrante del ADN. El nivel variable de expresión de los genes y/o las proteínas y las mutaciones que implican un cambio no sinónimo en la secuencia de aminoácidos pueden usarse como fundamento para diferenciar entre los pacientes que responden y los que no responden. Esto proporciona la accesibilidad del método de predicción, y la personalización de la terapia.

15 Los pacientes que no responden a los inhibidores de la metilación del ADN y padecen la resistencia primaria pueden eliminarse rápidamente del tratamiento ineficaz. Esto proporcionará beneficio a tales pacientes al escapar de los efectos secundarios relativos que podrían asociarse con el fármaco, el coste redundante de la terapia, y sugiere otro posible protocolo de tratamiento con el tiempo.

20 Los pacientes que inicialmente responden al fármaco pero que durante un tratamiento prolongado desarrollan el signo de progresión de la enfermedad al adquirir resistencia secundaria al fármaco, pueden resensibilizarse mediante el uso de un inhibidor de bromodominio en combinación con un inhibidor de la metilación del ADN. Esto proporcionar un régimen terapéutico alternativo para superar la resistencia y puede reducir la incidencia de desarrollar resistencia a un inhibidor de la metilación del ADN particular.

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir la sensibilidad de un paciente que padece una enfermedad cancerosa a una terapia con inhibidor de la metilación del ADN, que comprende determinar *in vitro* en células cancerosas tomadas del paciente y comparar con valores para el tipo parental de las células

- el nivel de expresión del gen que contiene bromodominios ASH1L, en el que el cambio en la expresión que determina resistencia es un aumento, y/o

- las mutaciones que implican el cambio no sinónimo en la secuencia de aminoácidos de la proteína que contiene bromodominios ASH1L:

	Cambio de aminoácido que determina resistencia		Mutación en líneas celulares parental frente a resistente	
	Posición	Referencia	Parental	Resistente
ASH1L	1429	Alanina	Alanina	Valina

2. Método para predecir la sensibilidad de un paciente que padece una enfermedad cancerosa a una terapia con inhibidor de la metilación del ADN según la reivindicación 1, que comprende además determinar *in vitro* en células cancerosas tomadas del paciente y comparar con valores para el tipo parental de las células

- el nivel de expresión de al menos un gen que contiene bromodominios adicional seleccionado del grupo que comprende:

Gen	Cambio en la expresión que determina resistencia
ATAD2	disminución
BAZ1B	disminución
BAZ2A	aumento
BAZ2B	disminución
BRD1	disminución
BRD3	disminución
BRD7	disminución
BRD8	disminución
BRWD1	aumento
CECR2	aumento
CREBBP	aumento
EP300	aumento
KAT2A	aumento
KAT2B	aumento
KMT2A	aumento
SMARCA2	aumento
SP100	aumento
SP110	aumento
TRIM66	disminución
ZMYND8	disminución
ZMYND11	disminución

y/o

- el nivel de expresión de al menos una proteína que contiene bromodominios seleccionada del grupo que comprende:

Proteína	Cambio en la expresión que determina resistencia
familia de ATPasa, proteína 2 que contiene dominio AAA	disminución
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 1A	disminución
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 1B	aumento
bromodominio adyacente a dominio de dedo de zinc, 2A	disminución
factor de transcripción de dedo PHD de bromodominio	aumento
proteína 2 que contiene bromodominio	disminución
proteína 8 que contiene bromodominio	aumento
región cromosómica de síndrome de ojo de gato, proteína 2 candidata	aumento

proteína de unión a CREB	disminución
metiltransferasa 2A específica de lisina (K)	aumento
polibromo 1	aumento
proteína de interacción con dominio de homología a pleckstrina	aumento
Proteína relacionada con SWI/SNF, asociada a la matriz, regulador de la cromatina dependiente de actina, subfamilia a, miembro 4	aumento
antígeno nuclear SP100	aumento
TAF1 ARN polimerasa II, factor asociado a proteína de unión a caja TATA (TBP), 250 kDa	aumento
proteína 28 que contiene motivo tripartito	disminución
proteína 33 que contiene motivo tripartito	aumento

y/o

- 5 - las mutaciones que implican el cambio no sinónimo en la secuencia de aminoácidos de al menos una proteína que contiene bromodominios adicional seleccionada del grupo que comprende:

	Cambio de aminoácido que determina resistencia		Mutación en líneas celulares parentales frente a resistentes	
	Posición	Referencia	Parental	Resistente
ATAD2	365	Serina	Serina	Fenilalanina
ATAD2B	207	Glutamina	Arginina	Glutamina
BAZ2A	1	Metionina	Isoleucina	Metionina
BAZ2A	650	Glicina	Glicina	Alanina
KAT2A	781	Arginina	Arginina	Prolina
SMARCA2	855	Arginina	Glutamina	Arginina
TRIM24	478	Prolina	Leucina	Prolina
TRIM24	512	Prolina	Leucina	Prolina
TRIM33	286	Leucina	Leucina	Prolina
TRIM66	630	Leucina	Valina	Leucina
TRIM66	324	Histidina	Arginina	Histidina
TRIM66	466	Histidina	Histidina	Arginina

3. Método según la reivindicación 2, en el que se determina el nivel de expresión de una combinación de al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez genes que contienen bromodominios y opcionalmente también el nivel de expresión de una combinación de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez proteínas que contienen bromodominios.
4. Método según la reivindicación 2, en el que se determinan las mutaciones en una posición de referencia dada en una combinación de al menos tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez genes que contienen bromodominios.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células cancerosas se derivan de un cáncer seleccionado de carcinomas, sarcomas, melanomas, linfomas y leucemia.