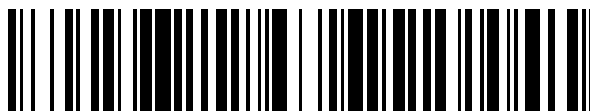


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 680**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2015** **PCT/GB2015/050895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015** **WO15145151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2015** **E 15714259 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2020** **EP 3123175**

54 Título: **Método para identificar un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a fármacos utilizando un ensayo de desplazamiento térmico**

30 Prioridad:

25.03.2014 GB 201405327

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

11.11.2020

73 Titular/es:

**PELAGO BIOSCIENCE AB (100.0%)
Nobels Väg 3
171 65 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ MOLINA, DANIEL y
NORDLUND, PAR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 792 680 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para identificar un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a fármacos utilizando un ensayo de desplazamiento térmico

La presente invención se refiere a métodos para identificar biomarcadores candidatos asociados a una respuesta reducida a fármacos, en particular utilizando análisis de desplazamiento térmico.

Más particularmente, la invención se refiere a métodos para identificar un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco que comprende las etapas de calentar una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco y una muestra de un paciente tratado con el fármaco pero con una respuesta reducida al fármaco, analizar, en cada muestra, los productos, para determinar las temperaturas de fusión de al menos una proteína e identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco. La al menos una proteína identificada es distinta de la proteína diana del fármaco. El método también puede utilizarse para producir un conjunto de datos que represente una huella molecular para investigar el desarrollo de resistencia a fármacos en otros pacientes. Además, se puede llevar a cabo un método de resolución celular, donde se pueda llevar a cabo una etapa de clasificación celular después de calentar las muestras, para permitir el análisis de un tipo de célula particular.

El cáncer es un enigma mundial y nacional cada vez mayor, y la creciente incidencia y las tasas de mortalidad son problemas cada vez mayores en muchas naciones, incluyendo Suecia. La actual incidencia anual de cáncer a nivel mundial es de aproximadamente 12,7 millones y se estima que superará los 20 millones en 2030. Lamentablemente, las mejoras en las estrategias terapéuticas han sido relativamente limitadas. Una gran parte de las terapias actuales contra el cáncer siguen dependiendo de fármacos convencionales ampliamente citotóxicos, mientras que recientemente se han añadido al arsenal terapéutico terapias más específicas contra el cáncer, con un éxito variable. Al mismo tiempo, la comunidad de investigación mundial ha hecho grandes avances analizando minuciosamente los procesos de cáncer a nivel molecular, celular y fisiológico (Hanahan y Weinberg, Cell 2011 144; 646). Cabe destacar que, las tecnologías de secuenciación de nueva generación que permiten realizar un análisis rápido de los genomas de los pacientes con cáncer, han generado un mapeo completo de mutaciones impulsoras en diferentes tipos de cáncer y actualmente se están explorando para comprender la heterogeneidad de los tumores y el desarrollo de la resistencia a los fármacos a nivel del genoma (Vogelstein, Science 2013 339; 1546).

Basándose en el creciente conocimiento de la biología fundamental del cáncer, actualmente se está explorando una gran cantidad de nuevas dianas farmacológicas oncológicas para el desarrollo de fármacos específicos. En la combinación correcta con otros fármacos, y con el uso de biomarcadores/diagnósticos complementarios, apropiados para la eficacia terapéutica, dichas alternativas han aumentado la esperanza de que se produzcan avances en la terapia contra el cáncer. Existen algunos ejemplos destacables de fármacos específicos satisfactorios, tales como, por ejemplo, inhibidores de BRAF en melanoma, inhibidores de BCR-Abl en el linfoma mieloide crónico, así como anticuerpos monoclonales dirigidos contra PD-1 (Fridlyand, Nat Rev Drug Discov 2013 12;743). Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos de los nuevos fármacos oncológicos son decepcionantes, subrayando la magnitud del desafío (Verma, Oncologist 2011 16;25, Amiri-Kordestani, J Natl Cancer Inst 2012 104;568). Las razones subyacentes de esto son las propiedades intrínsecas de los procesos de cáncer, la gran heterogeneidad clonal dentro de los tumores y entre diferentes pacientes, así como la rápida evolución de la resistencia a los fármacos durante la terapia (Soltyanik Exp Oncol 2010 32; 181).

Sin embargo, las firmas mutacionales o clonales de las células cancerosas son solo una parte de la historia (Niepel Curr Opin Chem Biol 2009 13; 556). Por ejemplo, los cambios epigenéticos y otros cambios celulares pueden transferirse tras la división celular. Lo que es más importante, las células cancerosas de los tumores dependen en gran medida del microambiente, que es muy heterogéneo, e interactúan con él. La diafonía con células vecinas, incluidas las células del estroma y las células del sistema inmunitario, influirán directamente en los procesos reguladores y metabólicos de la célula cancerosa. De manera similar, la topografía y la penetración de los vasos sanguíneos en el tumor regularán la disponibilidad de oxígeno y nutrientes, incluyendo la energía y los metabolitos esenciales, que posteriormente también afectará a los procesos reguladores y metabólicos de la célula cancerosa (Swartz, Cancer Res 2012 72; 2473). Por lo tanto, la diafonía local y el acceso al oxígeno y a los nutrientes influirán fundamentalmente en los procesos bioquímicos de la célula cancerosa. Cada vez es más evidente que los estados de estos procesos bioquímicos, y el grado al cual el fármaco puede modularlos, son determinantes críticos para la eficacia de los fármacos contra el cáncer. También cabe destacar, que las diferencias en el microambiente del tumor y la bioquímica de la célula cancerosa cambiarán fundamentalmente la capacidad de los fármacos para alcanzar la proteína diana prevista (Olive, Science 2009 324; 1457, Niepel, Science Signaling 2013 6;294).

Sin embargo, con las técnicas actuales, es difícil acceder a los procesos bioquímicos y a la acción farmacológica dentro del ambiente tumoral. Por lo tanto, la mejora de las estrategias para generar biomarcadores bioquímicos para monitorizar la acción farmacológica, incluido el desarrollo de la resistencia, será fundamental para el desarrollo de mejores terapias contra el cáncer en el futuro.

Molina et al., (2013) Science 341: 84-87 desvelan el uso de CETSA (siglas del inglés *cell thermal shift assay*, ensayo de desplazamiento térmico celular) para monitorizar la interacción con la diana farmacológica en células y tejidos.

El documento WO 2012/143714 desvela un método para determinar si una muestra no purificada contiene una proteína diana unida a un ligando de interés que comprende las etapas de: a) exponer dicha muestra no purificada a una temperatura que sea capaz de causar o mejorar la precipitación de la proteína diana no unida en mayor medida de la que es capaz de causar o mejorar la precipitación de la proteína diana unida a dicho ligando; b) procesar el producto de la etapa a) para separar la proteína soluble de la insoluble; y c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) para detectar la presencia de proteína diana, en donde dicha proteína diana no se detecta basándose en la actividad enzimática de una etiqueta, un péptido, un polipéptido o una proteína fusionada a los mismos. El documento WO2008030735 desvela un método para determinar la capacidad de respuesta de un paciente a un fármaco (c-met) evaluando, en una muestra, perfiles de expresión de biomarcadores.

Sorprendentemente, los inventores han desarrollado un método basado en un ensayo de desplazamiento térmico, que puede utilizarse para identificar biomarcadores bioquímicos candidatos asociados a la resistencia a fármacos en un paciente. Por tanto, el método puede utilizarse para identificar proteínas que se funden a diferentes temperaturas, en muestras de pacientes que responden a fármacos y de pacientes que no responden a fármacos, que se han tratado con el fármaco. Dichas proteínas representan biomarcadores bioquímicos candidatos, que pueden tener diferentes estados de activación en las muestras de pacientes sensibles y no sensibles. Aunque anteriormente se había notificado que los ensayos de desplazamiento térmico identifican la unión de un ligando (por ejemplo, un fármaco) con una proteína diana, no se había comprendido anteriormente que dichos ensayos podían utilizarse para investigar el estado (por ejemplo, el estado de activación) de otras proteínas de una muestra y que, por lo tanto, podían utilizarse para identificar biomarcadores de resistencia a fármacos.

Los inventores han descubierto que el uso de un ensayo específico de desplazamiento térmico permite monitorizar cambios bioquímicos en el estado de activación de diferentes proteínas. Las proteínas apenas tienen estados bioquímicos distintos y los inventores han demostrado que es posible diferenciar entre los estados de activación utilizando un ensayo específico de desplazamiento térmico. La diferenciación de estados de activación permite la identificación de proteínas que tienen un estado diferente en muestras sensibles y no sensibles a fármacos. Dichas proteínas representan biomarcadores candidatos de resistencia a fármacos.

Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado un ensayo que puede aplicarse a nivel del proteoma para descubrir nuevos biomarcadores asociados a la resistencia a los fármacos. Provechosamente, el nuevo método puede llevarse a cabo directamente en muestras obtenidas de un paciente, lo que permite, si se desea, que la etapa térmica del método se realice 3 minutos después de obtener la muestra del paciente. Por lo tanto, el método puede permitir una evaluación precisa de la bioquímica de la muestra y la identificación de biomarcadores candidatos de la falta de capacidad de respuesta a los fármacos.

La presente invención proporciona métodos como se definen en las reivindicaciones adjuntas. La invención proporciona un método para identificar, en un paciente, un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de:

- a) calentar ya sea i) una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco o ii) una muestra de un paciente que responde al fármaco;
- b) separar la proteína soluble de la insoluble de i) o ii); y
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) y compararlas con la fracción correspondiente obtenida al calentar y separar una muestra de un paciente que responde al fármaco cuando i) se calienta y se separa en las etapas a) y b), o compararlas con la fracción correspondiente obtenida al calentar y separar una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco cuando ii) se calienta y se separa en las etapas a) y b),

para identificar en la muestra al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente de la de la muestra de respuesta reducida al fármaco, en comparación con la de la muestra del paciente que responde al fármaco, en donde la proteína diana para el fármaco se excluye de la identificación.

En una realización, la invención proporciona un método para identificar, en un paciente, un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco,
- b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a),
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b),
- d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente tratado con el fármaco, en donde dicho paciente tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- e) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que no responde al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco.

Preferentemente, la etapa de análisis c) del método, determina la temperatura de fusión de una o más proteínas. Opcionalmente, la etapa d) puede realizarse en simultáneo con las etapas a) a c) o antes que estas. Cuando la etapa d) se realiza antes o después de las etapas a) a c), el período de tiempo entre la realización de las etapas puede ser cualquier período de tiempo, por ejemplo, algunos minutos (por ejemplo, entre 1 y 10 minutos), horas (por ejemplo, de 1, 2, 5, 10 horas), meses (de 1, 2, 5, 10 meses) o años (de 1, 2, 3, 4 o 5 años). Por lo tanto, las muestras pueden obtenerse y tratarse a diferentes momentos y no es necesario el procesamiento secuencial simultáneo o directo (aunque puede hacerse). Particularmente, se apreciará que en el caso de que las muestras se obtengan del mismo paciente, por ejemplo, de cuando respondieron al fármaco y de cuando desarrollaron una capacidad de respuesta reducida al fármaco, puede transcurrir un período de tiempo significativo entre la recogida y/o el procesamiento (por ejemplo, el calentamiento, la separación y/o el análisis) de las diferentes muestras (por ejemplo, meses o años, como se ha explicado anteriormente).

En otra realización, es posible que en los métodos de la invención, pueda utilizarse una muestra de un paciente que se sabe que responde a un fármaco, antes del tratamiento farmacológico o sin éste. De manera similar, en los métodos de la invención puede utilizarse una muestra de un paciente que se sabe que tiene una respuesta farmacológica reducida, antes del tratamiento farmacológico o sin éste. Aunque sin ligarse a la teoría, se cree que algunas respuestas a los fármacos pueden estar conectadas en una célula, incluso sin que haya exposición al propio fármaco. Por tanto, puede ser posible identificar los biomarcadores de una respuesta reducida a los fármacos simplemente comparando los resultados de los pacientes que se sabe que responden a los fármacos y de los pacientes que se sabe que tienen una respuesta reducida a los fármacos. Por tanto, la presente invención puede proporcionar un método para identificar en un paciente un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a),
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b),
- d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente que tenga una respuesta reducida al fármaco, y
- e) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco, en donde, opcionalmente, la etapa d) se lleva a cabo antes de o de manera simultánea a las etapas a) a c).

La invención proporciona un método para identificar en un paciente un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de:

- a) calentar ya sea i) una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco o ii) una muestra de un paciente que responde al fármaco;
- b) separar la proteína soluble de la insoluble de i) o ii); y
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) y compararlas con la fracción correspondiente obtenida al calentar y separar una muestra de un paciente que responde al fármaco cuando i) se calienta y se separa en las etapas a) y b), o compararlas con la fracción correspondiente obtenida al calentar y separar una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco cuando ii) se calienta y se separa en las etapas a) y b), para identificar, en la muestra, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente de la de la muestra con respuesta reducida al fármaco, en comparación con la de la muestra del paciente que responde al fármaco.

Particularmente, ambas muestras se habrán expuesto preferentemente a las mismas o similares etapas de calentamiento y separación, por ejemplo, calentadas a la misma temperatura (o a una temperatura similar, por ejemplo, entre 0,5 y 2° C) y/o separadas por el mismo método.

Una fracción "correspondiente" se refiere a la misma fracción en una muestra diferente. Por tanto, cuando en la muestra de respuesta reducida al fármaco se analiza una fracción soluble, en la muestra de respuesta al fármaco se analiza la fracción soluble. Además, las fracciones insolubles de las diferentes muestras se comparan entre sí (respuesta al fármaco y respuesta reducida al fármaco).

Particularmente, dicho paciente se ha tratado con el fármaco.

Por tanto, como se ha indicado en líneas anteriores, el método de la invención se refiere a la identificación de un biomarcador candidato de una respuesta reducida a un fármaco, por ejemplo, una resistencia o una falta de capacidad de respuesta a un fármaco. La invención se basa en la evaluación del estado de las proteínas procedentes de muestras de pacientes que responden y que no responden a fármacos, donde los inventores han determinado que es posible diferenciar el estado de activación de las proteínas en función de su temperatura de fusión. Por tanto, en la presente invención, una proteína que tiene una temperatura de fusión diferente en una muestra de un paciente que responde al fármaco en comparación con una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, por ejemplo, un paciente que no responde al fármaco, es probable que tenga un estado de activación diferente en las dos muestras y puede representar un biomarcador de la capacidad de respuesta al fármaco.

Las proteínas que tienen diferentes temperaturas de fusión en una muestra de pacientes que responden al fármaco y de pacientes que tienen una respuesta reducida al fármaco, tendrán diferentes solubilidades a temperaturas particulares. Por tanto, cuando en la etapa a) las muestras se calientan a una temperatura seleccionada, cualquier proteína (biomarcador) que tenga un estado de activación diferente en las muestras y cuyas temperaturas de fusión puedan distinguirse a la temperatura seleccionada, probablemente tendrá diferentes solubilidades. Por lo tanto, después del calentamiento, estas proteínas estarán presentes en diferentes cantidades en las fracciones solubles y/o insolubles de muestras de pacientes que responden al fármaco y de muestras de pacientes que tienen una respuesta reducida al fármaco (por ejemplo, muestras que no responden al fármaco). La invención se refiere principalmente al análisis de muestras procedentes de pacientes para identificar proteínas asociadas a una respuesta reducida a fármacos, por ejemplo, falta de capacidad de respuesta a fármacos. Dichas proteínas (biomarcadores) pueden utilizarse como una diana futura para combatir la resistencia a los fármacos en pacientes o pueden utilizarse para generar una huella molecular que pueda identificar una posible falta de respuesta a fármacos.

Aunque, como se ha indicado anteriormente, el método puede utilizarse para determinar la temperatura de fusión de al menos una proteína e identificar al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en las muestras que responden al fármaco y en las que tienen una respuesta reducida al fármaco, normalmente, el método puede utilizarse para determinar las temperaturas de fusión de una pluralidad de proteínas e identificar cualquiera de esas proteínas que tenga una temperatura de fusión diferente entre los dos tipos de muestra. Como se ha indicado en líneas anteriores, aunque en el método puede determinarse la temperatura de fusión de una o más proteínas, esto no es esencial para la identificación de uno o más biomarcadores. Una diferencia en la precipitación de una proteína particular en una muestra de un paciente que responde a un fármaco y en una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida a ese fármaco, es indicativa de que esa proteína puede ser un biomarcador de una respuesta reducida a ese fármaco.

Normalmente, como se ha explicado anteriormente, en el método se analiza más de una proteína y particularmente, con el método de la invención, pueden analizarse al menos 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 o más proteínas. Por tanto, utilizando el método de la invención pueden establecerse temperaturas de fusión y/o curvas de fusión de estas proteínas. Sin embargo, esto no es necesario y el método puede implicar simplemente analizar las fracciones solubles y/o insolubles de las muestras después de calentar a una temperatura seleccionada, para determinar si alguna proteína (o una sola proteína) muestra una diferencia en cuanto a la precipitación. Por lo tanto, el método de la invención puede proporcionar un análisis holoproteómico (de todo el proteoma) de muestras de pacientes y puede proporcionar una forma extremadamente eficiente de identificar cualquier proteína que tenga estados de activación variables entre muestras y que puedan representar biomarcadores candidatos de resistencia a fármacos. Como se indica con más detalle a continuación, aunque en la etapa c) pueden utilizarse muchas técnicas de análisis conocidas, preferentemente, cuando el método se utiliza para producir curvas de fusión de varias cantidades de proteínas, la espectrometría de masas puede utilizarse convenientemente para trazar un perfil de las proteínas.

La proteína, que es la diana del fármaco administrado al paciente, se excluye de la identificación de biomarcadores candidatos. Por tanto, si un paciente se ha convertido en un paciente que no responde al fármaco, es posible que el fármaco ya no se una a la proteína diana. En dichas circunstancias, la proteína diana puede tener una temperatura de fusión diferente entre las muestras que responden al fármaco y las que no responden al fármaco y puede identificarse en el método.

Por tanto, una realización particularmente preferida de la invención, proporciona un método para identificar, en un paciente, un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco,
- b) separar la proteína soluble de la insoluble del producto de la etapa a),
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) por espectrometría de masas para determinar la temperatura de fusión de una pluralidad de proteínas,
- d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente tratado con el fármaco, en donde dicho paciente tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- e) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que no responde al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco.

Particularmente, el método puede comprender calentar las muestras respectivas a un intervalo de diferentes temperaturas, por ejemplo, dividiendo cada muestra en diferentes alícuotas, para calentar cada una de ellas a una temperatura diferente, donde se requiere la determinación de la temperatura de fusión de una o más proteínas. Además, opcionalmente, la etapa d) puede realizarse en simultáneo con las etapas a) a c) o antes que éstas.

El método anterior puede realizarse en pacientes sin tratamiento farmacológico o antes del mismo, es decir, en una muestra de un paciente que responde al fármaco y en una muestra de un paciente con una respuesta reducida al fármaco.

Como se ha indicado en líneas anteriores, la expresión "una pluralidad de proteínas" como se usa en el presente documento, se refiere a más de una proteína, normalmente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10000 o más proteínas. Aunque en la presente invención pueden analizarse grandes cantidades de proteínas, la cantidad de posibles biomarcadores detectados puede ser, por supuesto, mucho menor. Por lo tanto, la invención proporciona la identificación de al menos un biomarcador (proteína con una temperatura de fusión diferente entre las dos muestras). Sin embargo, es posible que la invención pueda identificar más de 1 biomarcador candidato, por ejemplo, más de 3, 4, 5, 10, 15, 20 o 50 proteínas que tengan diferentes temperaturas de fusión entre las dos muestras (la muestra del paciente que responde al fármaco y la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco).

Además, como se ha indicado anteriormente, los datos generados a partir del método de la invención, pueden utilizarse como una huella molecular para el desarrollo de resistencia a un fármaco particular. En este caso, la invención proporciona además un método para generar un perfil proteómico a partir de una muestra, indicativo de una respuesta reducida a un fármaco en un paciente que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco,
- b) separar la proteína soluble de la insoluble,
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) para determinar la temperatura de fusión de una pluralidad de proteínas,
- d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente tratado con el fármaco, en donde dicho paciente tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- e) producir un perfil proteómico para la pluralidad de proteínas que indica diferencias cuantitativas entre las temperaturas de fusión obtenidas de las proteínas de la muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco y las temperaturas de fusión obtenidas de las proteínas de la muestra de un paciente tratado con el fármaco con una respuesta reducida al fármaco.

Como se ha indicado en líneas anteriores, la etapa d) de los métodos de la invención puede realizarse antes, después de las etapas a) a c) o en simultáneo con éstas. Además, el método anterior puede realizarse en pacientes sin tratamiento farmacológico o antes del mismo, es decir, en una muestra de un paciente que responde al fármaco y en una muestra de un paciente con una respuesta reducida al fármaco.

La diferencia o el desplazamiento en las temperaturas de fusión de una proteína, entre la muestra de un paciente que responde al fármaco y de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, puede ser de al menos 0,1°C, por ejemplo, de al menos 0,2, 0,3, 0,4, 0,5°C. Sin embargo, normalmente, cuanto mayor sea la diferencia o desplazamiento en las temperaturas de fusión, más probable será que la proteína sea un biomarcador significativo de resistencia a fármacos. Por tanto, preferentemente, la diferencia o desplazamiento en las temperaturas de fusión es de al menos 1, 2, 3 o 4°C.

El término "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier muestra que contenga una pluralidad de proteínas. Normalmente, la muestra es una muestra obtenida de un paciente (por ejemplo, un paciente humano o animal, por ejemplo, un perro, gato, mono, conejo, ratón, rata, etc.). Preferentemente, la muestra del paciente utilizada no se ha sometido a una etapa de lisis antes de llevar a cabo la etapa de calentamiento a). Por tanto, preferentemente, la muestra utilizada en la etapa a) contiene células intactas. Particularmente, Las proteínas a investigar están en el interior de las células o sobre ellas. La muestra puede ser una muestra de tejido, por ejemplo, de tejido epitelial, muscular, nervioso o conectivo, sangre, suero, plasma, linfa, líquido cefalorraquídeo, mucosidad, orina o heces, etc. Particularmente, la muestra puede ser una muestra tumoral líquida o sólida.

Para el método de la invención, la muestra utilizada en la invención puede dividirse en varias alícuotas de muestra, lo que requiere calentar la muestra a diferentes temperaturas. Por tanto, cada alícuota de muestra puede calentarse a una temperatura diferente. Por tanto, el número de muestras individuales utilizadas en la etapa de calentamiento a) puede depender del número de temperaturas diferentes a las que se desea exponer la muestra. En este caso, cada alícuota de muestra se calienta a una sola temperatura particular. Como alternativa, para el análisis, es posible calentar una muestra y eliminar una alícuota o una pequeña cantidad de muestra después de calentar a cada temperatura deseada.

Como se ha indicado en líneas anteriores, en la presente invención se utilizan dos tipos de muestra, concretamente, una muestra de un paciente que responde a un fármaco (y que preferentemente se ha tratado con ese fármaco) y una muestra de un paciente que no responde o que tiene una respuesta reducida a un fármaco (y que preferentemente se ha tratado con el fármaco). Por tanto, las muestras pueden tomarse de pacientes que responden al fármaco y de pacientes que tienen una respuesta reducida al fármaco, antes, después, durante o sin tratamiento farmacológico. Las dos muestras utilizadas en el método de la invención, es decir, las muestras que responden y no responden al fármaco, son, preferentemente, del mismo tipo. Por tanto, por ejemplo, si como muestra que responde al fármaco se utiliza una muestra de tejido de un tumor, preferentemente se utiliza el mismo tipo de muestra de tejido que el de la muestra de respuesta reducida al fármaco, por ejemplo, una muestra de tejido de un tumor. Además, preferentemente, las dos muestras se obtienen del mismo paciente, aunque en diferentes momentos. Por tanto, particularmente, se puede tomar

una muestra de un paciente en un momento en el que está respondiendo a un tratamiento farmacológico y se puede tomar una segunda muestra de ese paciente cuando presenta una respuesta reducida a un fármaco. Además, preferentemente, que las muestras se obtengan de un paciente que se esté tratando en condiciones equivalentes, por ejemplo, que el fármaco que se administra en el momento en que se obtienen ambas muestras sea el mismo fármaco, a la misma dosis, a través de la misma vía de administración, al mismo tiempo etc.

Como se ha indicado anteriormente, el paciente del que se obtiene la muestra puede tratarse, o se trata, con un fármaco. Preferentemente, la muestra que se utiliza en el método es, por lo tanto, una muestra en la que se espera que el fármaco tenga un efecto. Por lo tanto, si el fármaco es una terapia contra el cáncer dirigida a un tumor, la muestra utilizada en el método de la invención sería, preferentemente, una muestra tumoral.

Como se ha indicado en líneas anteriores, la muestra que puede utilizarse en la presente invención puede ser una muestra líquida o sólida de un paciente, por ejemplo, una muestra tumoral. Un experto apreciará que dicha muestra puede ser de naturaleza heterogénea y puede comprender diferentes tipos de células. En la presente invención también es posible llevar a cabo una etapa adicional de resolución celular antes de la etapa de análisis c) del método descrito anteriormente. Dicha etapa de resolución celular puede permitir el análisis de tipos de células particulares en la etapa c) que se han aislado de una muestra heterogénea, por ejemplo, un tumor. A este respecto, la invención proporciona una etapa adicional de clasificación celular de las muestras, preferentemente después de que se haya llevado a cabo la etapa de calentamiento. Sin embargo, es posible llevar a cabo la etapa de clasificación celular antes de calentar la muestra. Si la muestra es una muestra tumoral, también puede ser necesario realizar una etapa de degradación de la matriz tumoral antes de realizar cualquier etapa de clasificación celular. En la técnica se conocen bien métodos de clasificación de células, por ejemplo, FACS (siglas del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, clasificación de células activadas por fluorescencia). En una realización preferida, la presente invención proporciona por tanto un método para identificar en un paciente un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco,
- b) someter el producto de la etapa a) a clasificación celular para aislar un tipo de célula de interés
- c) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa b),
- d) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa c) por espectrometría de masas para determinar la temperatura de fusión de una pluralidad de proteínas,
- e) repetir las etapas a) a d) con una muestra de un paciente tratado con el fármaco, en donde dicho paciente tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- f) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco.

En una realización adicional, la invención proporciona un método para identificar, en un paciente, un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- b) someter el producto de la etapa a) a clasificación celular para aislar un tipo de célula de interés
- c) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa b),
- d) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa c) por espectrometría de masas,
- e) repetir las etapas a) a d) con una muestra de un paciente que tenga una respuesta reducida al fármaco, y
- f) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco.

Opcionalmente, la etapa e) puede realizarse antes que las etapas a) a d) o en simultáneo con estas. Particularmente, dicho paciente se ha tratado con el fármaco.

El término "biomarcador", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que está presente tanto en la muestra que responde al fármaco como en la muestra con respuesta reducida al fármaco, pero que tiene una temperatura de fusión diferente en cada una de esas muestras. Como se ha indicado en líneas anteriores, la diferencia en las temperaturas de fusión puede ser de al menos 0,1, 0,3, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 o 4° C. Por tanto, dicho biomarcador puede tener un estado de activación diferente entre los dos tipos de muestra y puede ser un biomarcador de resistencia a fármacos en ese paciente. El biomarcador no es la proteína diana a la que se une el fármaco para tratar la afección del paciente.

La expresión "respuesta reducida a un fármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta a un fármaco en un paciente que no es óptima en comparación con los resultados observados en otros pacientes o en comparación con los resultados que se obtuvieron inicialmente en ese paciente. Por tanto, una respuesta reducida a un fármaco puede medirse, por ejemplo, mediante una reducción en la eficacia del fármaco en cuanto a la cantidad de fármaco que necesite para tratar a un paciente, en cuanto al período de tiempo necesario para tratar a un paciente o en cuanto a una reducción en el efecto físico del fármaco, por ejemplo, en la reducción del volumen tumoral.

Particularmente, una respuesta reducida a un fármaco puede ser una reducción de al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % de la eficacia del fármaco, por ejemplo, en comparación con la respuesta inicial del paciente al fármaco o en comparación con una respuesta en otro paciente tratado con éxito con el fármaco. En los métodos de la invención, cuando el fármaco se utiliza para tratar a un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco en la etapa e) puede ser al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % menos eficaz que cuando el fármaco se utiliza para tratar a un paciente de la etapa a) que responde al fármaco. Además, una respuesta reducida a un fármaco incluye a un paciente que no responde al fármaco, es decir, en el que no se observa el efecto deseado del mismo. Por tanto, en este caso, es posible que el fármaco no trate la afección para la que se administró. Particularmente, en el caso del tratamiento de un cáncer, un paciente que no responde a un fármaco, puede que no tenga una reducción del volumen tumoral utilizando ese fármaco y puede experimentar un crecimiento tumoral.

A diferencia de esto, un paciente que "responde" a un fármaco es uno que responde al tratamiento con el fármaco, es decir, un paciente en el que la afección se trata con el fármaco. Por tanto, una dosis regular del fármaco tiene el efecto físico deseado en el plazo previsto. En el tratamiento del cáncer, un paciente que responde puede ser uno que experimente una reducción del volumen tumoral con el fármaco.

La expresión "perfil proteómico" como se usa en el presente documento, significa datos generados a partir de un método de la presente invención que muestra las diferencias en cuanto a las temperaturas de fusión de más de una proteína en la muestra. El perfil proteómico indica por tanto a qué temperaturas se funden diferentes proteínas en la muestra que responde al fármaco y en la muestra que no responde al fármaco. El perfil proteómico puede comprender información sobre la curva de fusión de cada proteína investigada, indicando el intervalo de temperatura al que se funde cada proteína en cada muestra.

El método de la invención puede comprender normalmente una etapa de comparación, donde las temperaturas de fusión de al menos una proteína de la muestra que responde al fármaco se comparan con la temperatura de fusión de al menos una proteína de la muestra con respuesta reducida al fármaco. La etapa de comparación puede dar como resultado la identificación de un biomarcador candidato si las temperaturas de fusión de la proteína entre las muestras son diferentes.

Como alternativa, cuando no se determinan las temperaturas de fusión, el método puede incluir una etapa de comparación para determinar cualquier diferencia en la solubilidad o precipitación entre las proteínas que están presentes en la muestra del paciente que responde al fármaco y en la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco. Particularmente, después del calentamiento, se pueden comparar las fracciones solubles y/o insolubles de cada muestra. Cualquier diferencia en la precipitación de una proteína entre las dos muestras indica que la proteína tiene una temperatura de fusión diferente en cada muestra y, por tanto, un estado de activación posiblemente diferente.

Además, en la presente invención, se puede llevar a cabo una etapa de lisis. Por tanto, los métodos de la invención pueden comprender una etapa de exponer una muestra a condiciones capaces de provocar la lisis celular de la misma. Preferentemente, cualquier etapa de lisis solo se lleva a cabo después de haberse llevado a cabo el calentamiento. Por tanto, es más preferible que la lisis no se lleve a cabo en la muestra del paciente antes de que se realice el calentamiento. La lisis puede ser no desnaturalizante, permitiendo que las proteínas diana conserven una conformación natural, es decir, plegada correctamente o similar a la natural. En el presente documento esto se denomina lisis natural. Esto puede llevarse a cabo químicamente o de otro modo utilizando reactivos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, en tampones suaves tales como PBS o Tris a pH fisiológico. El grado de lisis debe ser suficiente para permitir que las proteínas de la célula salgan libremente de la misma. Normalmente, cuando se trata de proteínas unidas a la membrana, la lisis se realiza en presencia de detergentes o anfílicos, por ejemplo Triton X-100 o dodecil maltósido, para liberar la proteína de la membrana. De manera alternativa, la etapa de lisis puede llevarse a cabo congelando y descongelando las células o colonias. Más preferentemente, la lisis se puede llevar a cabo utilizando tanto tampón de lisis natural como congelación y descongelación de las células. Preferentemente, el tampón de lisis contiene lisozima, por ejemplo, a 50-750 mg/ml, más preferentemente a 100-200 mg/ml. En tampón de lisis natural también puede haber ADNsa preferentemente a 250-750 mg/ml. El tampón de lisis natural puede contener, por ejemplo, Tris 20 mM, pH 8, NaCl 100 mM, lisozima (200 mg/ml) y ADNsa I (750 mg/ml). Para las proteínas que se sabe que se insertan en las membranas celulares, al tampón de lisis se añadirían detergentes a concentraciones habituales donde se sabe que las proteínas insertadas en la membrana solubilizan en una forma natural, tal como n-dodecil-β-maltósido al 1 %. Normalmente, las células se expondrán al tampón de lisis durante 15-60 minutos, preferentemente durante unos 30 minutos. preferentemente, la etapa de congelación y descongelación se repite, es decir, se realizan dos o más ciclos, preferentemente, 3 o más ciclos de congelación y descongelación. En una realización preferida, la lisis se logra mediante una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con tampón de lisis y tres x10 minutos de congelación y descongelación.

Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona adicionalmente un método para identificar en un paciente un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- b) exponer dicha muestra a condiciones capaces de causar la lisis celular,

- c) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a),
- d) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b),
- e) repetir las etapas a) a d) con una muestra de un paciente que tenga una respuesta reducida al fármaco e identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco,

en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco. Opcionalmente, la etapa e) puede llevarse a cabo antes que las etapas a) a d) o en simultáneo con estas. Particularmente, dicho paciente se ha tratado con el fármaco.

Normalmente, el porcentaje de células sometidas a lisis en una muestra (por ejemplo, una colonia celular u o cultivo celular) durante la etapa de lisis es del 5-100 %. Por tanto, cuando se realiza una etapa de lisis no es necesario que todas las células de una muestra se sometan a lisis.

Los métodos de la invención requieren que la muestra se caliente. Se pueden identificar las proteínas que tienen un perfil de precipitación diferente a esa temperatura en las dos muestras. La temperatura que se utiliza para el calentamiento puede ser cualquier temperatura, siempre que sea capaz de causar o mejorar la precipitación de una o más proteínas (biomarcadores) en una muestra (por ejemplo, la muestra que responde al fármaco) a un grado diferente en comparación con la otra muestra (por ejemplo, la muestra con respuesta reducida al fármaco).

Por tanto, una temperatura será capaz de causar una diferencia en la precipitación de una proteína con diferentes temperaturas de fusión en las dos muestras, si la temperatura seleccionada se encuentra entre las diferentes temperaturas de fusión de la proteína. Esto permitirá que la proteína con la temperatura de fusión más baja precipite, mientras que la forma de proteína con la temperatura de fusión más alta seguirá siendo soluble. Además, el calentamiento a una temperatura que se encuentre dentro del intervalo de temperatura en el que se funde una proteína en una forma particular (estado de activación), puede proporcionar una diferencia en la precipitación entre las formas de proteína con diferentes temperaturas de fusión. La selección de dicha temperatura puede dar como resultado que esa forma de la proteína esté presente en las fracciones de proteína tanto soluble como insoluble después de calentar a esa temperatura. Este perfil de precipitación será diferente al de la proteína cuando esté en un estado de activación diferente y con una temperatura de fusión diferente (tanto si la temperatura de fusión de esa proteína es mayor o menor).

Sin embargo, preferentemente, en los métodos de la invención, las muestras se exponen a una serie de temperaturas diferentes, particularmente cuando se desea determinar las temperaturas de fusión de cualquiera de las proteínas. La exposición a una serie de temperaturas diferentes puede permitir la identificación de más biomarcadores de respuesta reducida a un fármaco.

Por lo tanto, en una realización preferida, la invención proporciona un método para identificar, en un paciente, un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- (a) exponer una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco, a una serie de temperaturas diferentes,
- (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a),
- (c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) para determinar la temperatura de fusión de una o más proteínas,
- (d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente tratado con el fármaco, en donde dicho paciente tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- (e) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que no responde al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco.

Opcionalmente, la etapa d) puede llevarse a cabo antes que las etapas a) a c) o en simultáneo con estas. El método anterior puede realizarse en pacientes sin tratamiento farmacológico o antes del mismo, es decir, en una muestra de un paciente que responde al fármaco y en una muestra de un paciente con una respuesta reducida al fármaco.

Este método de la invención requiere que la muestra se exponga a una serie de temperaturas diferentes. Esto se refiere a una serie de temperaturas que pueden causar o mejorar la precipitación de una o más proteínas en la muestra y normalmente de uno o más biomarcadores. Por tanto, para identificar un biomarcador, es necesario que esta proteína tenga una temperatura de fusión diferente en las dos muestras investigadas (respuesta al fármaco frente a respuesta reducida al fármaco). Por lo tanto, este método de la invención requiere exponer las muestras a un intervalo de temperaturas diferentes, de las cuales, al menos una causará o mejorará la precipitación de al menos un biomarcador candidato, dependiendo del estado de activación en el que se encuentre. Normalmente, para esta finalidad, se adopta un intervalo de temperatura de 30 a 80°C, para examinar a qué temperaturas se funden las proteínas en una muestra, en comparación con la otra muestra, es decir, en la muestra que responde al fármaco frente a la muestra con respuesta reducida al fármaco. Por tanto, por ejemplo, se puede seleccionar una temperatura inicial de 30°C y aplicar a las muestras (alícuotas de la muestra) temperaturas de hasta 70° C o más altas. Las mediciones pueden realizarse en

cualquier intervalo, pero normalmente con un aumento de un grado, un aumento de dos grados o un aumento de tres grados en la temperatura.

Se sabe que algunos tipos de proteínas precipitan en un intervalo de temperatura pequeño. En este caso, se puede generar una curva de fusión en la que la temperatura de fusión inicial es la primera temperatura del intervalo y la temperatura de fusión final es la última temperatura del intervalo. Por tanto, la temperatura de fusión inicial es la temperatura más baja a la que una proteína (por ejemplo, un biomarcador candidato) comienza a precipitar, por ejemplo, al menos el 5 % de la proteína se precipita y la temperatura de fusión final es la primera temperatura a la que no se detecta la proteína diana soluble, por ejemplo, menos del 5 % de la proteína está en forma soluble. Normalmente, al menos el 95 % de la proteína se funde y precipita.

Por lo tanto, cuando una proteína (por ejemplo, un biomarcador candidato) precipita en un intervalo de temperatura, la proteína puede comenzar a precipitar o a desplegarse a una temperatura particular en cuyo punto la cantidad de proteína soluble presente comenzará a disminuir y la cantidad de proteína insoluble presente aumentará (ya que la estabilidad térmica está relacionada con la solubilidad). Por lo tanto, parte de la proteína soluble aún puede detectarse a la temperatura de fusión inicial hasta que se aplique una temperatura ligeramente más alta, en cuyo punto puede detectarse poca o ninguna proteína soluble.

La temperatura de fusión final de una proteína es, por lo tanto, una temperatura particular a la cual se detecta una disminución significativa de la proteína soluble, normalmente al menos el 95 % de la proteína es insoluble. Para proteínas problemáticas que tienen varias transiciones, cada una de estas transiciones puede dar como resultado que una cantidad más pequeña de proteína se vuelva insoluble (por ejemplo, al menos el 10 % de la proteína se vuelve soluble en cada transición). Cuando la proteína precipita en un pequeño intervalo de temperatura, donde el porcentaje de proteína soluble disminuye hasta que no pueda detectarse ninguna proteína soluble y, por tanto, la proteína se despliega o precipita por completo, se puede determinar una temperatura de fusión inicial y final. Por tanto, a la temperatura de fusión inicial de dicho intervalo de temperatura, es decir, la temperatura más baja a la que la proteína diana comienza a fundirse o precipitarse, al menos el 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 % de la proteína puede fundirse o precipitarse. Como alternativa a lo observado, a la temperatura de fusión inicial de un intervalo de temperatura, la cantidad de proteína soluble (por ejemplo, biomarcador candidato) detectada disminuye al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %. Además, la cantidad de proteína diana insoluble presente puede aumentar al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 %.

También es posible que una proteína (biomarcador candidato) pueda desplegarse y precipitarse a una temperatura específica. En este caso, preferentemente al menos el 95 % de la proteína estará en forma insoluble a una temperatura específica y, por tanto, la proteína no puede precipitar en un intervalo de temperatura pequeño. Por lo tanto, la temperatura de fusión inicial de dichas proteínas puede aproximarse a temperatura de fusión final.

Como se indicó anteriormente, el método de la invención, identifica proteínas con diferentes temperaturas de fusión entre muestras que responden al fármaco y muestras que tienen una respuesta reducida al fármaco. El método puede detectar un desplazamiento en la curva de fusión de una proteína particular si se funde en un intervalo de temperatura o una diferencia en la precipitación de una proteína a una temperatura particular.

El intervalo de temperatura que puede aplicarse en la presente invención puede incluir cualquier temperatura, incluida la temperatura de fusión inicial a la que una proteína biomarcadora candidata comienza a desplegarse en su estado de activación más inestable. Cualquier temperatura igual o superior a la temperatura de fusión inicial será capaz de causar o mejorar la precipitación de la proteína. Por tanto, una proteína con una mayor estabilidad térmica debido a un estado de activación diferente (por ejemplo, mediante la unión de una molécula pequeña) generalmente no se desplegará ni precipitará a esta temperatura y se detectará una mayor cantidad de proteína soluble en comparación con la proteína en el primer estado de activación que se ha desplegado completamente o se ha comenzado a desplegar. La temperatura es por tanto discriminatoria, causando o mejorando la precipitación del biomarcador candidato en su estado de activación más inestable en mayor medida de lo que causa o aumenta la precipitación de la proteína en el estado de activación más estable.

La etapa de calentamiento puede llevarse a cabo utilizando cualquier fuente de calor que pueda calentar una muestra a una temperatura particular. Por tanto, cuando la muestra está en forma líquida, entonces preferentemente la etapa de calentamiento puede llevarse a cabo en una máquina de PCR. Sin embargo, también pueden utilizarse incubadoras, baños de agua, etc.

Como se ha indicado en líneas anteriores, incubando la muestra a un intervalo completo de temperaturas, es posible determinar la temperatura a la que precipitan diferentes proteínas e identificar una proteína que se funda a diferentes temperaturas en las muestras que responden al fármaco frente a las muestras que tienen una respuesta reducida al fármaco. Normalmente, para producir una curva de precipitación de cada proteína, puede utilizarse un intervalo de temperatura donde las temperaturas utilizadas son aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10° C diferentes entre sí. Por tanto, la muestra podría incubarse a uno cualquiera de más de 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72 y 75° C, siempre que una de las temperaturas sea igual o mayor que la temperatura de fusión inicial de la

proteína, es decir, el biomarcador candidato. Cuando la muestra se calienta en un intervalo de temperatura, esto puede llevarse a cabo en una máquina de PCR en la que se puede ajustar una temperatura inicial y después aumentarla en la cantidad deseada después de un tiempo determinado, por ejemplo, 0,5, 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. Como se ha indicado anteriormente, se puede extraer una pequeña alícuota o cantidad de muestra (por ejemplo, 1 o 2 ml) después de calentar a cada temperatura para poder analizar la solubilidad de las proteínas.

Por tanto, el método de la invención puede aplicar un intervalo de temperaturas a una muestra de un paciente que responde al fármaco y a una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco. A cada temperatura ensayada, las muestras se analizan para determinar qué proteínas son solubles y/o insolubles. Los resultados se comparan (es decir, los de la muestra que responde al fármaco y los de la muestra con respuesta reducida al fármaco) para determinar qué proteínas precipitan a diferentes temperaturas en las dos muestras. Como se ha indicado anteriormente, cualquier diferencia de temperatura puede indicar que una proteína es un biomarcador de resistencia a fármacos o de falta de respuesta a fármacos. Sin embargo, las proteínas que muestran grandes diferencias de temperatura en la precipitación entre las muestras, pueden ser biomarcadores más significativos para la reducción de la respuesta a los fármacos en un paciente.

El método de la invención requiere además el uso de una etapa de separación (b) para separar las proteínas solubles de las insolubles. La etapa de separación puede implicar cualquier método de separación que sea capaz de separar la proteína soluble de la insoluble. Por ejemplo, se puede utilizar una etapa de centrifugación o de filtración. Por tanto, se puede utilizar un filtro para separar las proteínas solubles de las insolubles donde las proteínas solubles pasarán a través de un filtro. Para filtrar muestras calientes, pueden utilizarse membranas de filtro estándar, donde los filtros tendrán normalmente un tamaño de poro que varía de 0,015 mm a 12 mm, por ejemplo, de 0,35 a 1,2 mm. Por tanto, los filtros pueden tener tamaños de poro inferiores a 4,0 mm, o normalmente inferiores a 2,0 mm, por ejemplo, inferiores a 1,0 mm. Se apreciará que los filtros se fabrican y comercializan con un tamaño de poro particular, pero el proceso de fabricación puede ocasionalmente dar como resultado poros más pequeños o más grandes; siendo por tanto, los tamaños enumerados, que se refieren al diámetro, los tamaños de poro más habituales de un filtro dado. Aunque se hace referencia a un posible intervalo de tamaños de poro, cualquier filtro individual generalmente tendrá un tamaño de poro designado, por ejemplo, 0,45 mm. Los filtros adecuados son Super y GH polypro (de Pall) y Nucleopore (de Whatman).

Se apreciará que las proteínas de diferentes muestras y de diferentes tipos de células pueden requerir el uso de filtros con diferentes tamaños de poro. La selección de un filtro adecuado compete claramente a un experto en este campo. Por ejemplo, utilizando un conjunto de proteínas de ensayo para el tipo de célula o muestra deseada e investigando su comportamiento con filtros de diferentes tamaños de poro, es posible seleccionar un tamaño de poro apropiado.

Como alternativa a la filtración y centrifugación, se puede llevar a cabo la captura por afinidad de proteínas solubles. Muchos anticuerpos y reactivos de afinidad que reconocen la estructura plegada de la proteína se unirán a la proteína soluble con una afinidad mucho mayor que la de la proteína desplegada y precipitada. Además, el reconocimiento de etiquetas más pequeñas, tales como las etiquetas de polihistidina, que se unen a conjugados metálicos, a menudo se correlacionará con la solubilidad cuando estas etiquetas sean menos accesibles en la proteína precipitada. Los anticuerpos, conjugados metálicos y otros reactivos de afinidad, pueden unirse a perlas magnéticas o a la resina en columna que se mezcla con la muestra no purificada tratada con calor. En una etapa posterior, esta mezcla puede colocarse en una válvula apropiada y lavarse para eliminar la proteína insoluble cuando no tiene una alta afinidad con el reactivo de afinidad. La cantidad de proteína unida al reactivo de afinidad, posteriormente puede medirse utilizando, por ejemplo, técnicas de Bradford, electroforesis en gel, ensayos Elisa (inmunoabsorción enzimática) o detección por resonancia de plasmón superficial.

También es posible utilizar inmunoensayos homogéneos en los que la proteína se detecta con al menos dos anticuerpos diferentes, tales como los ensayos AlphaScreen, Elisa o de ligamiento de proximidad (PLA, siglas del inglés *proximity ligation assay*, Blokzijl, J Intern Med 2010 268;232). Cuando se ha establecido la combinación correcta de anticuerpos que reconoce específicamente las proteínas solubles, esto puede dar una señal directa de la cantidad de proteína soluble presente en la muestra, mientras que la proteína precipitada no proporciona una señal. Cuando dicha separación de la señal de la proteína soluble y la proteína precipitada puede realizarse directamente en un ensayo homogéneo, no se requiere separación física de la proteína soluble y precipitada para medir las curvas de fusión de esta proteína específica. Por tanto, cuando el método de detección implica el uso de dos anticuerpos diferentes, la etapa de separación b) puede excluirse. En esta realización, la invención proporciona un método para identificar, en un paciente, un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente tratado con el fármaco y que responde al fármaco,
- b) analizar el producto de la etapa a) utilizando al menos dos anticuerpos,
- c) repetir las etapas a) y b) con una muestra de un paciente tratado con el fármaco, en donde dicho paciente tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- d) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que no responde al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco.

Opcionalmente, la etapa c) puede realizarse antes que las etapas a) y b) o en simultáneo con estas. El método anterior puede realizarse en pacientes sin tratamiento farmacológico o antes del mismo, es decir, en una muestra de un paciente que responde al fármaco y en una muestra de un paciente con una respuesta reducida al fármaco.

Se apreciará que en este aspecto de la invención, otros reactivos de afinidad pueden ser capaces de detectar la proteína soluble en una muestra de manera similar a la de los dos anticuerpos descritos anteriormente. En este aspecto, nuevamente, el método puede no emplear una etapa de separación ya que la etapa de análisis implica la detección de una proteína soluble (o natural) utilizando dos o más reactivos de afinidad que se unen con una mayor afinidad a la forma soluble o natural de la proteína que a la forma de la proteína desplegada o insoluble (precipitada).

De esta manera, dichos reactivos de afinidad pueden determinar si las formas solubles o naturales de la proteína están presentes en una muestra después del calentamiento y, por tanto, se puede detectar cualquier diferencia en la precipitación de una proteína entre las muestras que responden a fármacos y las que no lo hacen. Los dos o más reactivos de afinidad deben ser capaces de distinguir conjuntamente entre formas solubles o plegadas y/o insolubles de una proteína y, por tanto, deben ser capaces de detectar proteínas solubles o naturales en un contexto de otras proteínas (tanto solubles como insolubles) y cualquier proteína insoluble que también pueda estar presente.

Esta forma del método de la invención es particularmente ventajosa ya que no hay ningún requisito específico para llevar a cabo una etapa de separación y particularmente no puede llevarse a cabo ninguna etapa de separación. A este respecto, el método de esta realización implica etapas de procesamiento mínimas, lo que posiblemente permite la automatización del método y un mayor rendimiento, donde se pueden manipular grandes cantidades de muestras.

El "reactivo de afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere por tanto a cualquier reactivo que sea capaz de unirse con una mayor afinidad a una forma soluble o natural de una proteína que a una forma desplegada y/o insoluble de la misma proteína. Un reactivo de afinidad que se une con una mayor afinidad a una forma soluble o natural de una proteína en comparación con la forma desplegada y/o insoluble de la proteína, tendrá un valor K_D más pequeño por su asociación con la proteína diana soluble o natural que por su asociación con la forma desplegada y/o insoluble de la proteína. Particularmente, un reactivo de afinidad de la presente solicitud puede tener un valor K_D que sea al menos 100 veces menor con respecto a la unión a la forma soluble o natural de la proteína que el valor K_D con respecto a la unión a la forma desplegada y/o insoluble de la proteína. En la técnica se conocen bien métodos para medir los valores K_D de los reactivos de afinidad. Por tanto, el uso de dos o más reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) para la detección de la proteína soluble o natural permite el uso de reactivos de afinidad que pueden tener una menor especificidad por la proteína soluble o natural que si se utilizara un solo reactivo de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo) para detectar la proteína soluble o natural. Como dos o más reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) deben estar unidos a la proteína soluble o nativa para dar lugar a su detección, se pueden utilizar reactivos de afinidad menos específicos y todavía puede resultar un método específico de detección de la proteína soluble o natural. Por tanto, puede producirse alguna unión de al menos uno de los reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) con la forma desplegada y/o insoluble de la proteína, aunque la unión a la forma soluble o natural de la proteína es preferencial y la asociación puede ser al menos 100 veces mayor que la asociación a la forma desplegada y/o insoluble de la proteína. De manera similar, cada reactivo de afinidad se une particularmente con mayor afinidad a la forma soluble o natural de la proteína que a cualquier otra proteína presente en la muestra.

En una realización particular, al menos uno de los reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) utilizados en el método, es capaz de unirse específicamente a la forma soluble o natural de la proteína, pero no a la forma desplegada y/o insoluble de la proteína (o a cualquier otra proteína). Por tanto, el reactivo puede unirse específicamente a la proteína soluble o natural y cualquier unión a la proteína desplegada y/o insoluble puede ser inespecífica y mínima. Por tanto, en este caso, un reactivo de afinidad es capaz de unirse específicamente y uno o más reactivos de afinidad distintos pueden ser capaces de unirse a la forma soluble o natural de la proteína con mayor afinidad que a la forma desplegada y/o insoluble de la proteína. Además, el método proporciona el uso de dos o más reactivos de afinidad que se unen específicamente a la forma soluble o natural de la proteína pero no a la forma desplegada y/o insoluble de la proteína.

Para distinguir la proteína soluble (o natural) de la proteína no plegada y/o insoluble, el reactivo de afinidad puede reconocer (particularmente reconocer de manera específica) un epítipo o una secuencia de la proteína que se expone en la forma soluble o natural de la proteína pero no en la forma desplegada y/o insoluble de la proteína. Los dos o más reactivos de afinidad reconocen diferentes epítipos o secuencias en la proteína y, por tanto, proporcionan un método más específico para distinguir proteínas solubles o naturales de proteínas no plegadas y/o insolubles, que cuando se identifica un solo epítipo o secuencia. (Aunque con proteínas que son homodímeros, los reactivos de afinidad pueden dirigirse al mismo epítipo). Por tanto, los dos (o más) reactivos de afinidad deben unirse a la proteína para determinar que está presente una forma soluble o natural de la proteína. Una detección positiva de la proteína soluble o natural solo se logra si los dos (o más) reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) están unidos.

El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un afficuerpo, un péptido, un aptámero, anticuerpos DART (siglas del inglés *Dual-Affinity Re-targeting*, de redireccionamiento de doble afinidad) u otra molécula pequeña que se una a la forma soluble o natural de una proteína con una mayor afinidad que a la forma

desplegada y/o insoluble de la proteína. Particularmente, al menos un reactivo de afinidad es un anticuerpo, y más particularmente, en el método se utilizan dos anticuerpos por proteína para la detección. Sin embargo, la invención también abarca el uso de diferentes reactivos de afinidad, por ejemplo, el uso de un anticuerpo y otro reactivo de afinidad. Dado que en cada muestra (es decir, en cada muestra que responde y no responde al fármaco) se puede

5 analizar más de una proteína, en cada etapa de análisis pueden utilizarse varios reactivos de afinidad, utilizándose al menos 2 reactivos de afinidad para cada proteína a detectar. Cuando se analizan varias proteínas, las señales generadas por la unión de los dos o más reactivos de afinidad a cada proteína deben ser diferentes.

La detección de los dos o más reactivos de afinidad (particularmente, dos anticuerpos) puede utilizarse mediante un

10 ensayo indicador que da como resultado un cambio de señal cuando los dos o más reactivos de afinidad se unen a la proteína soluble o natural. Generalmente, los dos o más reactivos de afinidad están marcados (particularmente con diferentes marcadores) y la estrecha proximidad de esos marcadores entre sí cuando se unen a través de los reactivos de afinidad a la forma soluble o natural de la proteína diana, da como resultado un cambio en la señal, por ejemplo, la

15 emisión de fluorescencia o la producción de luz o fluorescencia a una longitud de onda diferente (a los marcadores cuando se utilizan solos) o la extinción de la fluorescencia. Dichos ensayos indicadores a menudo se denominan ensayos indicadores de proximidad, por ejemplo, para la detección, en el presente método puede utilizarse un método basado en FRET (siglas del inglés *fluorescence resonance energy transfer*, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) (o una variante del mismo, tal como BRET (siglas del inglés *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*, transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia)), donde la estrecha asociación de un marcador

20 (una molécula donadora) unido a un reactivo de afinidad, con un segundo marcador (una molécula aceptora) unido a un reactivo de afinidad, da como resultado la producción o alteración de una señal. Por tanto, la presencia de los dos o más marcadores unidos a la proteína soluble o natural a través de los reactivos de afinidad, da como resultado un cambio de señal detectable. En una realización, por ejemplo, de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia), la transferencia de energía de los marcadores de la molécula donadora a la aceptora puede dar como

25 resultado la emisión de fluorescencia por parte de la molécula aceptora. De esta manera, el marcaje de dos (o más) reactivos de afinidad (anticuerpos) que se unen a la forma soluble de una proteína, con marcadores que tienen un cambio de señal cuando están muy próximos entre sí, puede dar como resultado la emisión de fluorescencia cuando ambos están unidos a la proteína soluble, permitiendo así la detección de la proteína diana soluble. Las moléculas donadoras y aceptoras utilizadas en los métodos basados en FRET/BRET son muy conocidas en la técnica e incluyen

30 pares tales como la proteína cian fluorescente y la proteína amarilla fluorescente (ambas variantes de la proteína verde fluorescente); y la luciferasa bioluminiscente y la YFP (siglas del inglés *yellow fluorescent protein*, proteína fluorescente amarilla). Dicho método requiere la unión de los dos (o más) reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) con la proteína soluble antes de que se logre la detección de cualquier señal (por ejemplo, luminiscencia). En este aspecto, un reactivo de afinidad puede marcarse con la molécula donadora y el segundo reactivo de afinidad puede marcarse

35 con la molécula aceptora.

Los marcadores que demuestran un cambio de señal cuando están muy próximos (por ejemplo, cuando se unen a través de reactivos de afinidad a la proteína soluble), por ejemplo, las moléculas donadoras y aceptoras, pueden estar

40 recubiertas o comprendidas dentro de poblaciones de perlas distintas que después pueden utilizarse para unirse a cada reactivo de afinidad (anticuerpo). Por tanto, las perlas recubiertas con uno de los marcadores (por ejemplo, la molécula donadora) pueden utilizarse unidas al primer reactivo de afinidad, por ejemplo, el anticuerpo y las perlas recubiertas con el segundo marcador (por ejemplo, la molécula aceptora) pueden utilizarse para detectar el segundo

45 reactivo de afinidad (por ejemplo, el anticuerpo). Cada población de perlas (por ejemplo, donadora o aceptora) puede conjugarse con un reactivo adicional para permitir la unión con el primer o segundo reactivo de afinidad (por ejemplo, anticuerpos). Por ejemplo, una población de perlas (donadora o aceptora) puede recubrirse con estreptavidina para permitir la unión con el reactivo de afinidad biotinilado (por ejemplo, anticuerpo) o puede conjugarse con proteína A para permitir la unión con un reactivo de afinidad de anticuerpo. En la técnica se conocen bien métodos de unión de perlas con reactivos de afinidad tales como anticuerpos.

Se apreciará que los dos o más reactivos de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) pueden marcarse (por ejemplo, con

50 moléculas donadoras o aceptoras) antes o después de su adición a la muestra. Sin embargo, particularmente, los reactivos de afinidad (anticuerpos) pueden marcarse antes de su adición a la muestra. El formato de ensayo AlphaScreen Surefire (Perkin Elmer) puede utilizarse particularmente en el método de la invención, donde se pueden unir otros anticuerpos a las perlas proporcionadas (véase Osmond et al., *Analytical biochemistry*, 403, 94-9101, 2010.

Otros métodos de detección de los reactivos de afinidad unidos incluyen ensayos de ligamiento de proximidad (tal

55 como Duolink de Olink) y ELISA.

En la técnica se conocen bien métodos para producir reactivos de afinidad, tales como anticuerpos que pueden unirse

60 a la forma soluble de una proteína pero no a la forma insoluble de una proteína. Por ejemplo, el estudio de la estructura 3D de una proteína soluble e insoluble puede permitir la determinación de epítomos que están expuestos en la forma soluble pero no en la forma insoluble. Los anticuerpos o péptidos que se unen a dichos epítomos pueden producirse después utilizando métodos estándar.

Además, se conocen métodos que pueden utilizarse para identificar pares de anticuerpos que se unen a una proteína,

65 por ejemplo, métodos que emplean biodetectores por resonancia de plasmón superficial o ELISA. Además, Bembenek

et al (Analytical Biochemistry, 408, 2011, 321-327,) dieron a conocer un método de exploración basado en perlas utilizando la captura de anticuerpos en perlas Alphascreen de proteína A para analizar y seleccionar pares de anticuerpos capaces de unirse a la misma diana.

5 Se describe un método para determinar en un paciente si una proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- 10 b) analizar el producto de la etapa a) para detectar la presencia de la forma soluble de dicha proteína utilizando al menos dos reactivos de afinidad que son capaces de unirse a la proteína soluble con una afinidad más alta que a una forma de la proteína desplegada o insoluble,
- c) repetir las etapas a) y b) con una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, y
- d) determinar si hay alguna diferencia en la cantidad de proteína soluble presente en las muestras que responden al fármaco y las que tienen una respuesta reducida al fármaco,
- 15 en donde si se detecta una diferencia, la proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco.

Particularmente, dicho paciente se ha tratado con el fármaco.

20 En esta divulgación, la muestra puede calentarse particularmente a una temperatura que sea capaz de causar la precipitación de la proteína en un estado de activación en mayor medida de lo que sea capaz de causar la precipitación de la proteína en un estado de activación diferente. Particularmente, la muestra puede calentarse a una temperatura que se encuentre en intervalo de temperatura al que se funda la proteína (es decir, en una forma o un estado de activación) o entre las diferentes temperaturas de fusión de la proteína cuando se encuentre en los diferentes estados de activación en las muestras que responden al fármaco y las que tienen una muestra reducida al fármaco.

Se desvela un método para identificar en un paciente un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de:

- 30 a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- b) analizar el producto de la etapa a) utilizando al menos dos reactivos de afinidad que sean capaces de unirse a una proteína soluble con una afinidad más alta que a una forma de la proteína desplegada o insoluble,
- c) repetir las etapas a) y b) con una muestra de un paciente que tenga una respuesta reducida al fármaco y
- d) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una
- 35 temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que no responde al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida.

Particularmente, en esta divulgación, dicha al menos una proteína que tiene una temperatura de fusión diferente en las muestras que responden al fármaco y en las que tienen una respuesta reducida al fármaco, se identifica detectando una diferencia en la cantidad de una forma soluble de una proteína presente en las dos muestras. Opcionalmente, la etapa c) puede realizarse antes que las etapas a) y b) o en simultáneo con estas.

Particularmente, dicho paciente se ha tratado con el fármaco.

45 De acuerdo con los métodos de la invención, para detectar la presencia de una proteína diana, es posible analizar cualquiera (o ambas) de las fracciones insolubles o solubles. Sin embargo, si la etapa de análisis requiere el uso de reactivos de afinidad que sean capaces de unirse a una proteína soluble con una afinidad más alta que a una forma de la proteína desplegada o insoluble, entonces se analiza la fracción soluble (donde también se emplea una etapa de separación) o se analiza toda la muestra (si no se emplea etapa de separación). En los métodos donde se analiza la fracción insoluble, esta fracción se solubiliza preferentemente antes del análisis, por ejemplo, las proteínas precipitadas pueden disolverse en tampón de carga antes de su aplicación a geles de separación. Preferentemente, los métodos de la invención implican una etapa (c) (o d) cuando se lleva a cabo una etapa de clasificación celular de analizar la fracción (o fracciones) de la proteína. Por tanto, los métodos de la invención comprenden particularmente una etapa de análisis. Por tanto, las proteínas solubles obtenidas después de la etapa de separación (o después del calentamiento si no se lleva a cabo la separación) se analizan preferentemente para detectar la presencia de proteína. Por tanto, si se llevó a cabo una etapa de separación por centrifugación, el sobrenadante puede analizarse para detectar la presencia de la proteína diana y dónde se realizó una etapa de separación por filtración, las proteínas que pasan a través del filtro, es decir, el filtrado, puede analizarse para detectar la presencia de proteínas.

60 Las proteínas pueden detectarse mediante varios métodos diferentes.

La detección puede basarse en la unión por afinidad entre una proteína y un resto de detección, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un afflicuerpo (compañero de unión proteico no basado en Ac). Preferentemente, las proteínas pueden detectarse utilizando anticuerpos, monoclonales o policlonales, dirigidos a la proteína. Cuando el método se utiliza para investigar una pluralidad de proteínas, el análisis de las proteínas puede llevarse a cabo utilizando una matriz de anticuerpos. Dichos métodos permiten realizar un análisis rápido y fiable de

una amplia variedad de proteínas. Para cuantificar proteínas pueden utilizarse matrices de afinidad de proteínas basadas en anticuerpos específicos. Por ejemplo, un anticuerpo de cinasa presenta anticuerpos monoclonales específicos contra 276 proteínas cinasas humanas diferentes (Full Moon Biosystems).

Sin embargo, en una realización preferida de la invención, la fracción soluble de la etapa b) o la fracción insoluble solubilizada de la etapa b) puede analizarse con espectrometría de masas, por ejemplo, utilizando espectrometría de masas (EM) semicuantitativa o preferentemente cuantitativa. En un experimento de resonancia de ciclotrón iónica por transformación de Fourier utilizando un instrumento orbitrap, normalmente pueden detectarse de manera simultánea 1000-10 000 proteínas en una muestra de un lisado. Preferentemente, el análisis de CL-EM (cromatografía de líquidos con espectrometría de masas) se procesará utilizando una estrategia de marcaje isobárico tal como ITRAQ, pero preferentemente con TMT10 (Thermo-Fisher Scientific) que permite medir y normalizar 10 temperaturas para cada muestra en el mismo experimento. La medición por EM se realizaría en un instrumento tal como un Orbitrap Q Executive o Fusion (Thermo-Fisher Scientific). La medición de las 10 temperaturas para cada proteína se puede utilizar posteriormente para describir la curva de fusión característica. En una realización preferida, un barrido de temperatura de las células seguido de lisis, filtración y en una etapa final la detección de todas las proteínas solubles restantes mediante espectrometría de masas, a cada temperatura del barrido, permite medir las curvas de precipitación en paralelo de muchas proteínas. Este análisis global de curvas de fusión proteómicas permite la identificación de proteínas que tienen diferentes temperaturas de fusión entre las muestras de pacientes examinadas en la presente invención. El análisis global de curvas de fusión proteómicas de los cambios de desplazamiento térmico, permite que esto se realice para las proteínas que están disponibles a un nivel suficiente para ser detectables con EM.

Por lo tanto, la etapa de análisis de los métodos de la invención generalmente requiere la detección de al menos una proteína en cualquiera de las fracciones solubles o insolubles, o en la muestra si no se lleva a cabo la etapa de separación. La etapa de identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, implica comparar las fracciones solubles de cada muestra para determinar si una proteína (o varias) está presente en diferentes cantidades. Como alternativa, o adicionalmente, después del calentamiento, las fracciones insolubles de cada muestra pueden compararse para determinar si una proteína (o varias) está presente en diferentes cantidades. Particularmente, si la muestra se calienta a una temperatura que se encuentra entre las temperaturas de fusión de una proteína en diferentes estados de activación, una proteína puede estar presente solo en las fracciones solubles o insolubles en una muestra que responde al fármaco, pero no presente en la fracción correspondiente en una muestra con respuesta reducida al fármaco, o viceversa.

La detección de una "cantidad diferente" de proteína puede estar relacionada con la cantidad real de una proteína que está presente, pero más particularmente puede estar relacionada con la cantidad relativa de una proteína que está presente. La cantidad relativa de una proteína puede determinarse comparando las cantidades de esa proteína en las fracciones solubles e insolubles de la misma muestra (por ejemplo, como un porcentaje, relación o fracción). Por tanto, si en la fracción soluble de una muestra solo hay una proteína, entonces la cantidad relativa de proteína que hay en esa fracción puede indicarse como que es del 100 %. Si las cantidades relativas de una proteína en una fracción particular difieren entre las muestras, entonces es probable que la proteína sea un biomarcador. Una cantidad de proteína puede diferir en al menos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 %.

Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para identificar biomarcadores de resistencia a fármacos, como se ha indicado en líneas anteriores. Por tanto, los biomarcadores identificados por el método de la invención pueden utilizarse para guiar la terapia contra el cáncer. Es posible investigar la farmacoterapia a través de investigaciones repetidas de muestras de tumores antes y durante la terapia. Por tanto, las muestras clínicas de cánceres resistentes y metastásicos pueden analizarse y compararse con muestras iniciales para establecer el alcance y el mecanismo de resistencia a fármacos a nivel bioquímico. Además, las muestras de tumores recientes pueden servir como análogos de lugares de cáncer *in vivo*. El tratamiento de muestras de tumores recientes con diferentes fármacos y la monitorización de las respuestas bioquímicas iniciales utilizando los biomarcadores identificados, tienen la posibilidad de proporcionar información crítica sobre cómo responderá un cáncer a nivel bioquímico a un conjunto de fármacos.

Los métodos de la invención también serán útiles para abordar la eficacia y el desarrollo de resistencia durante la terapia de combinación. Los cambios bioquímicos complejos debido a la resistencia serán posibles de determinar utilizando biomarcadores identificados por los métodos de la invención.

Se desvela un método para determinar en un paciente la capacidad de respuesta a fármacos, que comprende:

- (a) calentar una muestra de un paciente tratado con dicho fármaco
- (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a) y
- (c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) para detectar la presencia de una proteína diana.

En este método, la proteína diana puede ser cualquier proteína que sea indicativa de la capacidad de respuesta a fármacos, por ejemplo, un biomarcador. Particularmente, la proteína diana puede tener un estado de activación diferente en pacientes que responden a fármacos frente a pacientes que tienen una respuesta reducida a fármacos.

Por lo tanto, la identificación de un estado de activación particular de una proteína en una muestra puede ser indicativa de la capacidad de respuesta fármacos en un paciente.

Se desvela un método para determinar el estado de activación de una proteína en una muestra que comprende:

- (a) calentar una muestra
- (b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a) y
- (c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) para detectar la presencia de la proteína.

Como se ha descrito anteriormente, el estado de activación de una proteína en una muestra, por ejemplo, una muestra de un paciente, puede determinarse calentando la muestra a una temperatura que produzca una diferencia en la precipitación entre los estados de activación de una proteína. Por tanto, al calentar una muestra para una proteína particular, el estado de activación de esa proteína puede determinarse investigando la cantidad de proteína precipitada.

En una divulgación adicional, el método también puede utilizarse para determinar si un fármaco producido de forma recombinante o un fármaco desarrollado recientemente tiene la misma estructura o una estructura similar a la de un fármaco aprobado o a la de otro fármaco de referencia. En este caso, el método puede utilizarse para determinar si un fármaco todavía se une a su diana y puede generarse una curva de fusión de la proteína para compararla con la del fármaco aprobado (o de referencia) y el producido de forma recombinante. Como alternativa, para fármacos proteicos, el método puede utilizarse para determinar directamente si un fármaco proteico producido de forma recombinante tiene la misma estructura o una estructura similar a la de un fármaco aprobado (o fármaco de referencia). En este caso, se puede producir una curva de fusión tanto para el fármaco producido de forma recombinante como para el fármaco aprobado (o fármaco de referencia) y éstas curvas pueden compararse. Es probable que un fármaco producido de forma recombinante con una curva de fusión similar o igual a la de un fármaco aprobado, tenga una estructura similar. El fármaco producido de forma recombinante y el fármaco aprobado (o fármaco de referencia) también pueden calentarse a una sola temperatura y la diferencia de precipitación a esa temperatura puede compararse para determinar si las estructuras son similares. Por tanto, se desvela un método para investigar la identidad estructural entre un fármaco producido de forma recombinante y un fármaco aprobado (o fármaco de referencia), que comprende las etapas de:

- a) calentar una muestra que comprende un fármaco producido de forma recombinante,
- b) analizar el producto de la etapa b)
- c) repetir las etapas a) y b) con una muestra que comprenda un fármaco aprobado o un fármaco de referencia,
- d) identificar cualquier diferencia en la temperatura de fusión del fármaco producido de forma recombinante y el fármaco aprobado o el fármaco de referencia, en donde una diferencia en las temperaturas de fusión es indicativa de una diferencia en las estructuras. Opcionalmente, la etapa c) puede llevarse a cabo antes que las etapas a) y b) o en simultáneo con estas

En el método anterior, un fármaco producido de forma recombinante puede producirse mediante cualquier método recombinante conocido de la técnica, por ejemplo, expresión en una célula bacteriana. Un fármaco aprobado es aquel cuya comercialización ha sido concedida en un país. Un fármaco de referencia es cualquier fármaco con el que se desea comparar la estructura del fármaco producido de forma recombinante. Como se ha indicado anteriormente, el método anterior puede implicar preferentemente calentar las muestras a un intervalo de temperaturas para determinar cualquier diferencia en las curvas de fusión.

La invención se describirá ahora más adelante en los siguientes ejemplos no limitativos en los que:

La Figura 1 es una vista esquemática de la invención aplicada para generar biomarcadores para el desarrollo de resistencia a fármacos. Los biomarcadores de desarrollo de resistencia muestran diferencias significativas en las curvas de fusión entre muestras de pacientes resistentes y no resistentes (ilustradas con flechas)

La Figura 2 es un ensayo de desplazamiento térmico que muestra la identificación de los estados bioquímicos de biomarcadores. A) p53 con dos oligos dúplex afines (PG1 y PG2) añadidos a células A549 sometidas a lisis que contienen p53 de tipo silvestre, b) Ribonucleótido reductasa R2 en una forma empobrecida en metal y con el cofactor de hierro natural, c) proteína cinasa A, respuesta al tratamiento con AMPc por los dominios reguladores (Reg) y catalíticos.

La Figura 3 muestra - a) Una viabilidad de muestras de ensayo de desplazamiento térmico resueltas en células compuestas por fibroblastos y linfocitos donde solo se trataron los linfocitos con el fármaco antiangiogénico TNP-470 según lo informado por la estabilización de la proteína diana Metionina aminopeptidasa-2 (figura insertada, una banda oscura muestra la presencia de proteína termoestabilizada).

Ejemplo 1

Materiales y métodos

La línea celular de cáncer humano A549 (ATTC n.º CCL-185) se cultivó en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) que contenía L-glutamina 0,3 g/l y se complementó con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Gibco/life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), 100 unidades/ml de penicilina y 100 unidades/ml de estreptomicina (Gibco/life Technologies) a pases de corta duración (3-15) en una cámara incubadora (con CO₂ al 5 %).

Los lisados de las células se prepararon recogiendo células y suspendiendo el sedimento celular en solución salina tamponada con fosfato (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*) a una concentración celular de 100000 células/ml., congelando y descongelando durante tres ciclos en N₂ (l) y las células sometidas a lisis se aclararon de los residuos celulares mediante centrifugación. El lisado aclarado se dividió en tres partes iguales, y se complementó con oligos de ADN PG1 o PG2 disueltos en agua ultrapura, y como control se añadió una misma cantidad de agua a la tercera alícuota.

Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las tres muestras se dividieron en alícuotas en tiras de PCR de 8 tubos y se calentaron durante 3 minutos a temperaturas en aumento (de 36 a 57° C con aumentos de tres grados). Después de calentar, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada se separó por centrifugación a 20000*g durante 17 minutos. Los sobrenadantes restantes, que contenían diversas cantidades de proteína soluble, se sometieron a análisis SDS-Page (por las siglas del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) y transferencia Western estándar utilizando un anticuerpo p53 primario específico (Santa Cruz Biotechnology SC-126) a una dilución de 1:400 en leche dietética desnatada. Las bandas de proteína resultantes en las membranas de transferencia Western se integraron y se representaron gráficamente utilizando el programa informático Graphpad Prism 6.0. En la figura 2a pueden observarse los resultados del ensayo de desplazamiento térmico.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

Las células se cultivaron y se sometieron a lisis como se describe en el Ejemplo 1. Después de eliminar el lisado, el sobrenadante se dividió en partes iguales, una complementada con una concentración final de EDTA 5 mM para quelar iones metálicos. La muestra de control se complementó con una misma cantidad de agua ultrapura. Después de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, los lisados se dividieron en alícuotas en tiras de PCR de 8 tubos y se calentaron durante 3 minutos a temperaturas en aumento (de 68 a 78° C con aumentos de dos grados). Después de calentar, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada se separó por centrifugación a 20000*g durante 17 minutos. Los sobrenadantes restantes, que contenían diversas cantidades de proteína soluble, se sometieron a análisis SDS-Page y transferencia Western estándar utilizando un anticuerpo RNR R2 primario específico (Santa Cruz Biotechnology SC-10846) a una dilución de 1:400 en leche dietética desnatada. Las bandas de proteína resultantes en las membranas de transferencia Western se integraron y se representaron gráficamente utilizando el programa informático Graphpad Prism 6.0. En la figura 2b pueden observarse los resultados del ensayo de desplazamiento térmico.

Ejemplo 3

Materiales y métodos

Las células se cultivaron y se sometieron a lisis como se describe en el Ejemplo 1. Después de eliminar el lisado, el sobrenadante se dividió en partes iguales, una complementada con una concentración final de AMP cíclico 1 mM disuelto en agua ultrapura. La muestra de control se complementó con una misma cantidad de agua ultrapura. Después de incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente, los lisados se dividieron en alícuotas en tiras de PCR de 8 tubos y se calentaron durante 3 minutos a temperaturas en aumento (de 40 a 80° C con aumentos de cuatro grados). Después de calentar, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada se separó por centrifugación a 20000*g durante 17 minutos. Los sobrenadantes restantes, que contenían diversas cantidades de proteína soluble, se sometieron a análisis SDS-Page y transferencia Western estándar utilizando un anticuerpo de proteína cinasa A primario específico contra la subunidad catalítica alfa y la subunidad reguladora 1 alfa (Santa Cruz Biotechnology SC-48412 y SC-136231, respectivamente) a una dilución de 1:400 dilución en leche dietética desnatada. Las bandas de proteína resultantes en las membranas de transferencia Western se integraron y se representaron gráficamente utilizando el programa informático Graphpad Prism 6.0. En la figura 2c pueden observarse los resultados del ensayo de desplazamiento térmico.

Ejemplo 4

Materiales y métodos

La línea celular de cáncer humano K562 y la línea celular de fibrosarcoma de ratón T241 con expresión endógena de GFP, se cultivaron a pases de corta duración (3-15) en una cámara incubadora. Las células T241 se trataron con el inhibidor TNP-470 de MetAP-2 (concentración final 2 mM) durante una hora en la cámara incubadora. Después de la incubación, las células se lavaron mediante centrifugación repetida para sedimentar las células y redissolver en PBS.

Después de esta etapa, las células se agruparon en un tampón de PBS. Esta mezcla de células se sometió después a clasificación FACS utilizando un MoFlo XDP de Beckman Coulter. Las células se clasificaron por su fluorescencia GFP (*Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente) (T241) o por la ausencia de fluorescencia (K562). Las células clasificadas se dividieron en alícuotas en tiras de PCR de 8 tubos y se sometieron a calentamiento a temperaturas que variaban de 44 a 52° C con aumentos de dos grados. Después del calentamiento, las células se ultracongelaron en N₂ (l) y se congelaron-descongelaron. Los residuos celulares resultantes, junto con la proteína precipitada, se sedimentaron por centrifugación a 20000*g durante 20 minutos. Los sobrenadantes, que contenían diversas cantidades de la proteína diana (MetAP-2), se sometieron a análisis SDS-Page y transferencia Western estándar utilizando un anticuerpo MetAP-2 primario específico (Santa Cruz Biotechnology SC-365637) a una dilución de 1:400 en leche dietética desnatada.

El lisado de las células se preparó recogiendo células y suspendiendo el sedimento celular en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración celular de 100000 células/ml, congelando y descongelando durante tres ciclos en N₂ (l) y las células sometidas a lisis se aclararon de los residuos celulares mediante centrifugación. El lisado aclarado se dividió en tres partes iguales y se complementó con oligos de ADN PG1 o PG2 disueltos en agua ultrapura, y como control se añadió una misma cantidad de agua a la tercera alícuota.

Después de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, las tres muestras se dividieron en alícuotas en tiras de PCR de 8 tubos y se calentaron durante 3 minutos a temperaturas en aumento (de 36 a 57° C con aumentos de tres grados). Después de calentar, las muestras se enfriaron y la proteína precipitada se separó por centrifugación a 20000*g durante 17 minutos. Los sobrenadantes restantes, que contenían diversas cantidades de proteína soluble, se sometieron a análisis SDS-Page y transferencia Western estándar utilizando un anticuerpo p53 primario específico (Santa Cruz Biotechnology SC-126) a una dilución de 1:400 en leche dietética desnatada. Las bandas de proteína resultantes en las membranas de transferencia Western se integraron y se representaron gráficamente.

Se sembraron las mismas cantidades de células (0,5-1,0x10⁶ células por punto de datos) en matraces de cultivo celular T-25 (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos) o en placas de cultivo celular de 12 pocillos (Corning Inc., Corning, NY, Estados Unidos) en un volumen apropiado de medio de cultivo y se expusieron a un fármaco durante 3 horas en una cámara incubadora (con CO₂ al 5 %) (Memmert GmbH, Schwabach, Alemania). Las células de control se incubaron con un mismo volumen de diluyente para el fármaco correspondiente. Después de la incubación, las células se recogieron (directamente o se separaron de la superficie utilizando solución de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich)) y se lavaron con PBS para eliminar el exceso de fármaco. Las mismas cantidades de suspensión celular se dividieron en alícuotas en microtubos de PCR de 0,2 ml, y el exceso de PBS se eliminó por centrifugación para dejar en cada microtubo una cantidad de PBS de 10 ul o inferior. Estos sedimentos celulares se utilizaron para el ensayo de desplazamiento térmico.

Para experimentos de inhibiciones de transporte, se sembraron las mismas cantidades de células K562 (0,6x10⁶ células por punto de datos) en placas de cultivo celular de 12 pocillos en un volumen apropiado de medio de cultivo y se incubaron previamente con un inhibidor de transporte (suramina o NBMPR) durante 30 minutos en una cámara incubadora. Las concentraciones apropiadas de inhibidor se determinaron en experimentos preliminares de ensayo de desplazamiento térmico (datos no mostrados). Las células de control se incubaron con un mismo volumen de DMSO. Después, las células se expusieron a diversas concentraciones de un fármaco apropiado (metotrexato o 5-FU, respectivamente) durante 3 horas en una cámara incubadora. Después de la incubación, los medios que contenían el fármaco se eliminaron por centrifugación; las células se recogieron, se lavaron con PBS y se prepararon para el CETSA como se describió anteriormente.

Para experimentos de evolución temporal, se sembraron las mismas cantidades de células K562 (0,6x10⁶ células por punto de datos) en matraces de cultivo celular T-25 y se expusieron a diversas concentraciones de raltitrexed. Se eliminaron alícuotas de cultivo celular en los tiempos especificados; para el ensayo de desplazamiento térmico, las células se lavaron con PBS y se prepararon como se ha descrito anteriormente.

Para los experimentos de realimentación, se sembraron las mismas cantidades de células K562 (0,6x10⁶ células por punto de datos) en placas de cultivo celular de 12 pocillos en un volumen apropiado de medio de cultivo y se expusieron a diversas concentraciones de raltitrexed durante 10 min., 30 min. o 3 horas en una cámara incubadora. Después de la incubación, los medios que contenían el fármaco se eliminaron por centrifugación; para el ensayo de desplazamiento térmico, las células se recogieron, se lavaron con PBS y se prepararon como se ha descrito anteriormente. Los medios eliminados se utilizaron para resuspender células K562 no tratadas recién sedimentadas (0,6x10⁶ células por punto de datos). Estas suspensiones celulares se transfirieron a nuevas placas de cultivo celular de 12 pocillos y se incubaron durante 3 horas más. Para el ensayo de desplazamiento térmico, las células se recogieron, se lavaron y se prepararon como se ha descrito anteriormente.

Los resultados pueden observarse en la Figura 3.

Ejemplo 5

El objetivo general de este experimento es predecir la respuesta farmacológica de perfiles de CETSA holoproteómicos

de células de muestras de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA). Estos perfiles reflejan la activación específica de procesos celulares, tales como el metabolismo, la señalización celular, la transducción de señales y los procesos de transporte, en la muestra específica del paciente, procesos donde es probable que algunos también cambien cuando se añaden los fármacos.

Los conjuntos de datos de CETSA holoproteómicos de referencia, se miden para cohortes de pacientes que responden significativamente mejor a uno de los dos tipos de regímenes terapéuticos de la LMA, específicamente las terapias 1) 7+3 y 2) FLAG-IDA (fludarabina y filgrastim (FLAG) + idarrubicina (FLAG-IDA)). En cada muestra de referencia se utilizaron 5 pacientes. Las mediciones se realizaron a partir de muestras antes de iniciar la terapia, donde una muestra se midió sin adición de fármaco y donde una muestra se midió con adición de fármaco durante 4 horas *ex vivo*. El historial de respuesta posterior de los pacientes después de ensayar ambas terapias condujo a su asignación a uno de los dos grupos de referencia. Los perfiles de referencia de CETSA medidos dieron características para los pacientes que respondieron a las dos terapias 1) y 2). Posteriormente, se realizaron mediciones de CETSA en 7 pacientes (A-G) para proporcionar confirmación adicional para la terapia inicial que sería apropiada para estos pacientes.

Para establecer correlaciones entre los pares de pacientes, el paciente 1 y el paciente 2, las diferencias entre las curvas de fusión de las proteínas correspondientes en las dos muestras de los pacientes se determinaron como las diferencias para la medición de la proteína F soluble restante (eje X en las curvas de fusión típicas) para todos los puntos de temperatura (eje Y en las curvas de fusión típicas), véase la fórmula 1. Las curvas de fusión que se utilizarán para las mediciones de correlación, se seleccionaron utilizando una estrategia similar a la de Savitski et al., donde se excluyeron las proteínas con curvas de fusión planas y alta varianza. Las temperaturas iniciales se graduaron a 1,0. La diferencia de las curvas de fusión de todas las proteínas se sumaron y se dividieron entre el número de proteínas para dar una diferencia promedio, el factor R, entre la medición del CETSA para el paciente 1 y 2. Normalmente, para la comparación de pares de pacientes, se utilizaron más de 3000 proteínas, solapantes en dos conjuntos de datos de pacientes. La correlación de las muestras en cada uno de los dos grupos de referencia utilizando las terapias 1) y 2) respectivamente, es mejor que la de cualquier correlación cruzada entre los dos grupos (tabla 1).

$$\text{Fórmula 1: Factor R} = \frac{1}{N} \sum_{Temp=1,10} \frac{1}{N} \sum_{N=1-N_{proteinas}} (\text{Abs}(FP1_{Temp,N} - FP2_{Temp,N}))_{Temp,N/N}$$

Donde $FP1(2)_{Temp,w}$ es la proteína soluble restante a la temperatura Temp del paciente 1 (o 2), $N_{proteinas}$ es el número de proteínas solapantes utilizadas en la comparación.

De las 7 muestras de pacientes sin referencia, 5 se correlacionan significativamente mejor (tienen factores R más bajos) con uno de los dos grupos, mientras que 2 tienen una correlación similar a la del grupo 1) y 2). Las 5 muestras de correlación dan entonces indicaciones de que la terapia debe seleccionarse como para los grupos de referencia, es decir, los pacientes A, C, F debe probar 1) la terapia 7+3 mientras que los pacientes B y G deben probar 2) la terapia con FLAG-IDA. El progreso de la respuesta podría seguirse posteriormente tomando muestras después de 1-2 días de tratamiento para correlacionarlo con la respuesta del CETSA para los grupos de referencia después de 1-2 días (no realizado en el presente experimento).

Tabla 1 Correlaciones del factor R entre diferentes conjuntos de datos del CETSA de pacientes. Por encima de la diagonal, muestras no tratadas con fármacos y por debajo de la diagonal, muestras tratadas con fármacos. PN, K donde N es el número de paciente y K es el tipo de terapia. PA a PG son pacientes con respuestas conocidas.

	P1,1	P2,1	P3,1	P4,1	P5,1	P1,2	P2,2	P3,2	P4,1	P5,2	PA	PB	PC	PD	PE	PF	PG
P1,1	1,0	1,71	2,43	1,92	1,86	2,94	4,34	5,15	3,72	3,74	2,32	3,92	2,32	5,79	4,12	1,92	5,62
P2,1	2,31	1,0	2,73	1,94	2,36	3,73	3,42	4,37	3,75	3,75	1,91	3,19	2,38	4,63	5,73	2,43	4,33
P3,1	2,51	2,50	1,0	1,99	2,10	4,47	5,78	3,72	5,78	3,72	1,79	4,63	1,91	3,72	4,31	1,73	3,68
P4,1	2,71	2,82	1,91	1,0	1,91	3,76	4,76	4,58	4,76	4,23	2,41	3,43	1,99	3,34	4,26	1,77	2,97
P5,1	2,51	1,81	1,92	2,71	1,0	2,42	3,58	3,53	3,77	3,54	2,91	2,63	2,51	4,29	3,64	1,75	3,64
P1,2	3,63	2,74	2,91	3,51	4,10	1,0	1,99	2,40	2,10	2,34	3,43	2,62	2,32	4,78	4,26	2,62	1,77
P2,2	2,75	3,73	3,71	3,33	3,43	1,73	1,0	1,30	1,88	1,54	2,93	2,65	4,74	5,38	3,54	3,76	1,76
P3,2	3,14	3,12	4,85	2,74	3,75	2,16	2,20	1,0	1,54	1,91	4,63	2,33	5,52	4,27	4,53	3,67	2,77
P4,2	2,73	3,88	3,71	3,57	3,76	2,28	2,41	1,77	1,0	1,74	3,93	2,48	4,78	4,75	5,32	4,38	2,13
P5,2	3,96	3,42	3,71	4,22	4,72	1,92	1,91	1,67	1,71	1,0	4,87	1,96	4,54	3,82	4,42	3,96	1,74
PA	1,71	2,56	2,33	1,97	1,75	2,63	2,92	3,61	2,47	3,37	1,0						
PB	3,23	3,93	3,53	2,63	2,93	1,91	1,83	2,42	1,99	1,86		1,0					
PC	1,95	1,99	2,73	2,51	1,94	2,61	3,31	3,14	2,95	3,53			1,0				
PD	3,97	4,95	3,72	3,63	4,99	4,86	3,34	2,21	4,17	3,14				1,0			
PE	3,93	4,47	2,23	4,88	3,97	4,39	5,93	3,92	4,37	3,87					1,0		
PF	2,7	1,91	2,51	2,53	2,35	3,63	3,63	3,63	3,63	3,63						1,0	
PG	2,93	5,13	3,55	4,33	5,63	2,73	3,20	2,91	2,44	2,91							1,0

Material y métodos

- Células de pacientes con LMA: Para recoger blastocitos de pacientes con LMA, se utilizó sangre periférica o aspirado de médula ósea, después de obtener el consentimiento informado del paciente. Las células mononucleares se aislaron con Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences). Se seleccionaron muestras de 5 pacientes de referencia con mejor respuesta a 1) terapia 7+3 y de 5 pacientes de referencia con mejor respuesta a 2) terapia con FLAG-IDA. también se seleccionaron 7 pacientes cuya respuesta no se conocía.
- Experimento de CETSA: Las células de cada paciente se dividieron en dos muestras que se procesaron en paralelo. Una muestra se incubó durante 4 horas a 37° C con una combinación de fármacos terapéuticos para simular la exposición inicial al fármaco terapéutico, mientras que la otra muestra se incubó durante 4 horas con vehículo (el tampón para la combinación de fármacos terapéuticos). Los experimentos del CETSA se realizaron de manera similar a los de Martínez Molina et al. Resumiendo, para los experimentos del CETSA se distribuyeron células y 10 partes alícuotas de cada muestra de paciente correspondiente a las curvas de fusión (etapas de 37°C a 67°C, 3° C). Las muestras se calentaron en paralelo en una máquina de PCR durante 3 minutos a la temperatura respectiva, seguido de 3 minutos de incubación a 20° C. Las células se sometieron posteriormente a lisis utilizando tres ciclos de congelación y descongelación y se solubilizaron en tampón. Después, las muestras se centrifugaron a 90 000 g durante 25 minutos a 4°C. Las fracciones solubles se aislaron y posteriormente se utilizaron para el análisis de EM.
- Experimento de EM: para el marcaje isobárico de péptidos se utilizó TMT 10-plex (TMT10, Thermo-Fisher) para permitir medir en cada experimento, 10 temperaturas en cada muestra de pacientes. Los experimentos de EM se realizaron de manera similar a la de Savitski et. al. En resumen, el fraccionamiento previo de las muestras antes de la inyección en un Q Exactive (Thermo Scientific), se realizó utilizando cromatografía de fase inversa a pH alto. Posteriormente, las muestras se inyectaron en un nanoRLSC Ultimate3000 (Dionex) con columnas de fase inversa de 50 cm x 100 mM (Reprosil). La identificación y cuantificación de las proteínas se realizó utilizando Mascot 2.4 y Proteome Discoverer.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar en un paciente un biomarcador indicativo de una respuesta reducida a un fármaco, que comprende las etapas de:

- a) calentar ya sea i) una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco o ii) una muestra de un paciente que responde al fármaco;
- b) separar la proteína soluble de la insoluble de i) o ii); y
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) y compararlas con la fracción correspondiente obtenida al calentar y separar una muestra de un paciente que responde al fármaco cuando i) se calienta y se separa en las etapas a) y b), o bien compararlas con la fracción correspondiente obtenida al calentar y separar una muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco cuando ii) se calienta y se separa en las etapas a) y b),

para identificar, en la muestra, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente de la de la muestra con respuesta reducida al fármaco, en comparación con la de la muestra del paciente que responde al fármaco, en donde la proteína diana para el fármaco se excluye de la identificación.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende las etapas de

- a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- b) separar la proteína soluble de la insoluble en el producto de la etapa a),
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b),
- d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente que tenga una respuesta reducida al fármaco, y
- e) identificar, en la muestra del paciente que responde al fármaco, al menos una proteína que tenga una temperatura de fusión diferente en comparación con la de la muestra del paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, en donde dicha proteína es un biomarcador indicativo de una respuesta reducida al fármaco, en donde, opcionalmente, la etapa d) se lleva a cabo antes de o de manera simultánea a las etapas a) a c).

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho paciente ha sido tratado con dicho fármaco.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa c) determina la temperatura de fusión de una o más proteínas.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la fracción soluble o insoluble de la etapa b) se analiza mediante espectrometría de masas.

6. Un método para generar un perfil proteómico de una muestra, indicativo de una respuesta reducida a un fármaco en un paciente que comprende las etapas de:

- a) calentar una muestra de un paciente que responde al fármaco,
- b) separar la proteína soluble de la insoluble,
- c) analizar una o ambas fracciones solubles e insolubles de la proteína de la etapa b) para determinar la temperatura de fusión de una pluralidad de proteínas,
- d) repetir las etapas a) a c) con una muestra de un paciente que tenga una respuesta reducida al fármaco, y
- e) producir un perfil proteómico para la pluralidad de proteínas que indique las diferencias cuantitativas entre las temperaturas de fusión obtenidas para las proteínas de la muestra de un paciente que responde al fármaco y las temperaturas de fusión obtenidas para las proteínas de la muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco,
- en donde opcionalmente la etapa d) puede realizarse antes de o de manera simultánea a las etapas a) a c).

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha muestra es una muestra de tejido, preferentemente en donde dicha muestra de tejido es sangre, suero, plasma, linfa, líquido cefalorraquídeo, mucosidad, orina, heces o es una muestra de tumor líquido o sólido.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha muestra de un paciente que responde al fármaco y dicha muestra de un paciente que tiene una respuesta reducida al fármaco, son del mismo tipo.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha muestra de un paciente que responde al fármaco y dicha muestra de un paciente con una respuesta reducida al fármaco, se toman del mismo paciente en diferentes momentos.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde antes de dicha etapa de análisis, se lleva a cabo una etapa de clasificación celular.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que además comprende una etapa de lisis,

preferentemente en donde dicha etapa de lisis se lleva a cabo después de la etapa a).

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde las muestras se exponen a una serie de temperaturas diferentes.

5 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha etapa de separación se lleva a cabo por filtración o centrifugación.

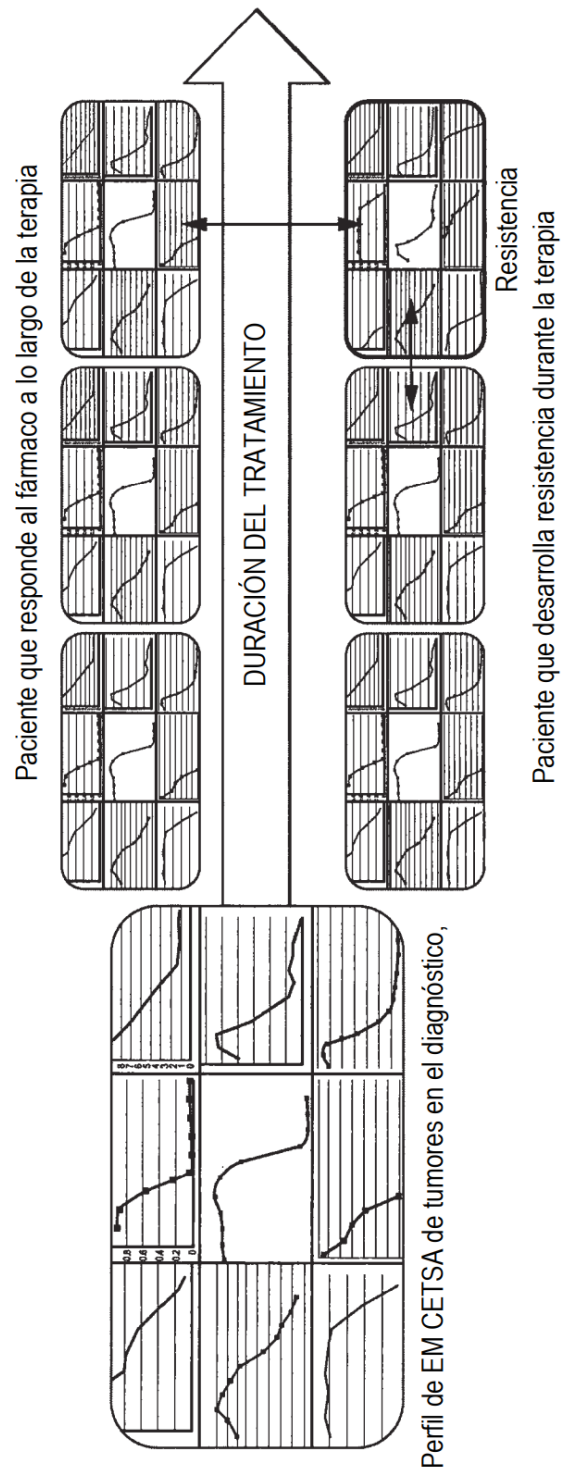


FIG. 1

Unión de ADN de TS de p53

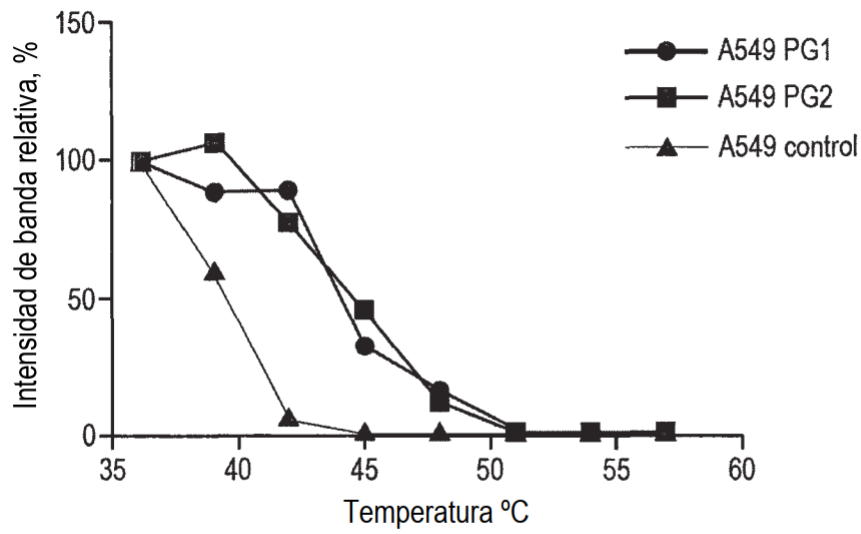


FIG. 2A

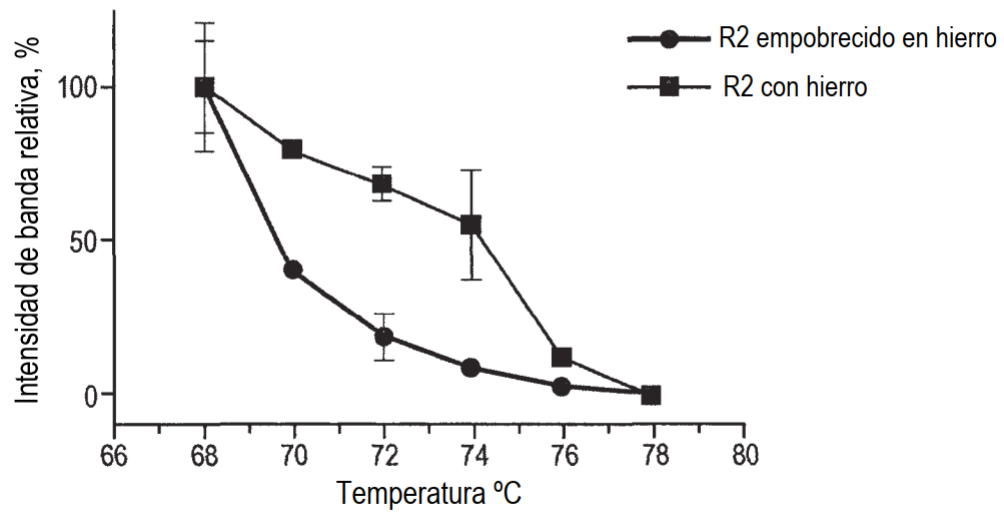


FIG. 2B

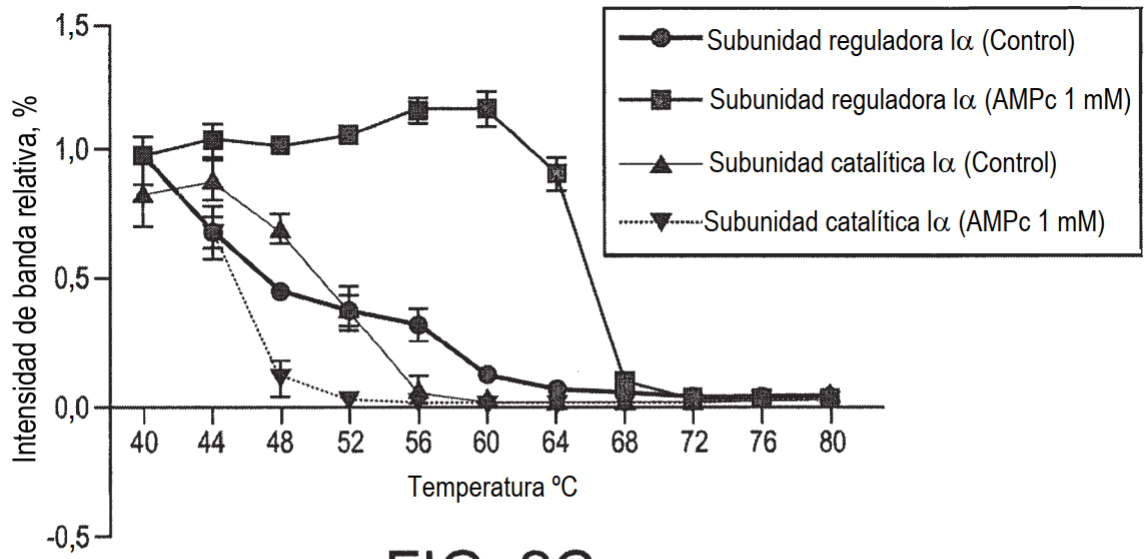


FIG. 2C

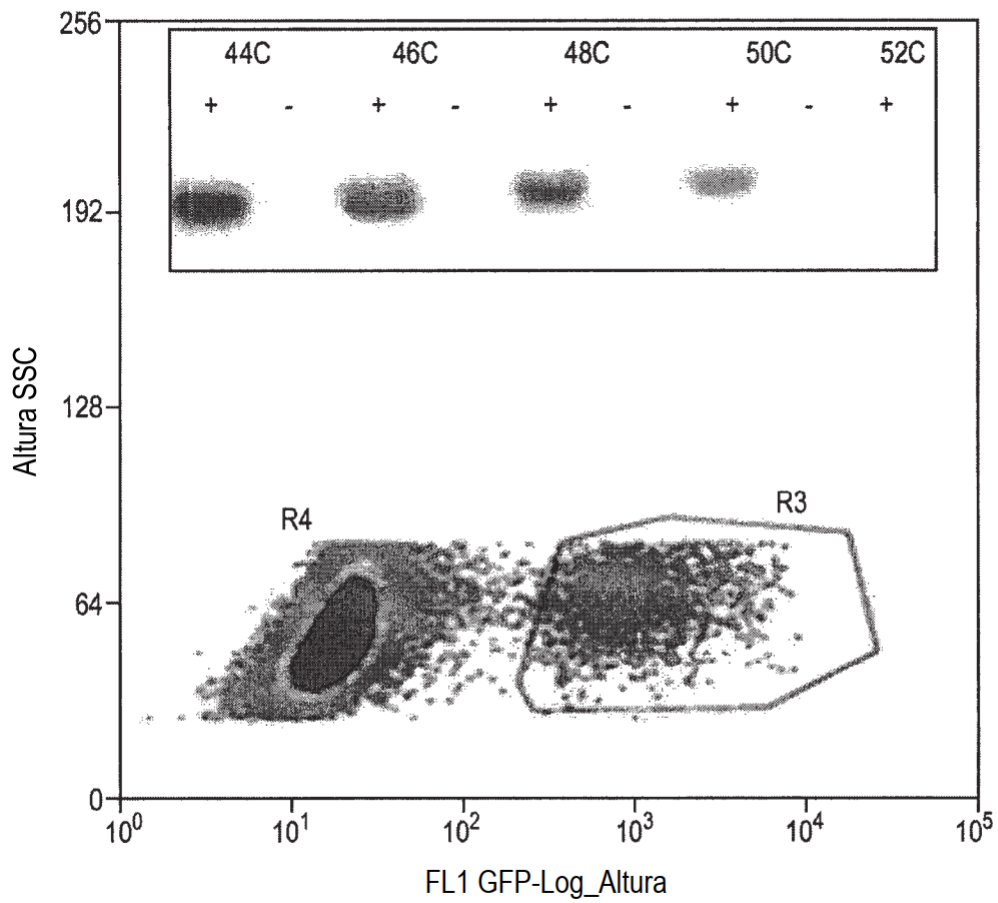


FIG. 3