

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 596**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07842865 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012 EP 2064549**

54 Título: **Matrices a base de anticuerpos para detectar transductores de señales múltiples en células de rara circulación**

30 Prioridad:

**21.09.2006 US 525598**  
**20.04.2007 US 913087 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.03.2013**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)**  
**Avenue Nestlé 55**  
**1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**HARVEY, JEANNE;**  
**SINGH, SHARAT;**  
**KIM, PHILLIP;**  
**LIU, XINJUN;**  
**BARHAM, ROBERT y**  
**LIU, LIMIN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 398 596 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

Matrices a base de anticuerpos para detectar transductores de señales múltiples en células de rara circulación

## 5 ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

En la sangre de pacientes en diferentes fases tempranas de cáncer se encuentran con frecuencia células tumorales, como "micrometástasis" (células tumorales diseminadas), que también se encuentran en cánceres metastásicos. El número de células tumorales en sangre depende de la fase y del tipo de tumor. Los tumores son extremadamente heterogéneos. Por consiguiente una biopsia de un solo lugar puede no ser representativa de la heterogeneidad de una población tumoral. Las biopsias se obtienen habitualmente de tumores primarios; sin embargo no se hacen biopsias de la mayoría de tumores metastásicos, lo cual dificulta todavía más el análisis molecular de muestras de tumores.

15 Durante la metástasis tumoral las células tumorales más agresivas abandonan el tumor primario y viajan a través de la sangre y del sistema linfático para alcanzar una ubicación alejada. Por tanto las células tumorales circulantes de la sangre representan la población más agresiva y homogénea de células tumorales. El número de células tumorales metastásicas en la sangre puede variar desde una hasta varios miles de células por milímetro de sangre. Por tanto se necesitan métodos específicos y sensibles para detectar estas células con fines diagnósticos y pronósticos. La presente invención satisface esta necesidad y además ofrece ventajas relacionadas.

## BREVE RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención proporciona un método para realizar un inmunoensayo multiplex de alto rendimiento con rango dinámico superior, que consiste en:

- 25 (a) incubar un extracto celular con varias series de dilución de anticuerpos de captura específicos para uno o más analitos del extracto celular, a fin de formar varios analitos capturados, estando los anticuerpos de captura sujetos a un soporte sólido;
- 30 (b) incubar todos los analitos capturados con anticuerpos detectores específicos de los respectivos analitos, para formar varios analitos capturados detectables, de modo que los anticuerpos detectores comprenden:
- (1) varios anticuerpos independientes del estado de activación, marcados con glucosa oxidasa y
- (2) varios anticuerpos dependientes del estado de activación, marcados con un primer miembro de un par de amplificación de señal que es una peroxidasa,
- 35 y la glucosa oxidasa genera peróxido de hidrógeno, que es canalizado hacia el primer miembro del par de amplificación de señal y reacciona con él;
- (c) incubar todos los analitos capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señal, para generar una señal amplificada; y
- (d) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de señal.

## 40 DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra tres anticuerpos unidos específicamente a un analito activado.

45 La figura 2 muestra un esquema de ensayo en el cual los anticuerpos marcados que se han unido específicamente a un analito activado están sujetos a un soporte sólido.

La figura 3 muestra la detección del RFCE total en células A431, empleando anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpo de captura y anticuerpo detector en un ensayo ELISA. (a) Curva estándar del sándwich ELISA. La sensibilidad fue de aproximadamente 0,25 pg/pocillo, empleando un dominio extracelular recombinante de RFCE humano. (b) Curva de valoración celular. La concentración de RFCE en células A431 se detectó mediante ELISA. (c) Tabla de concentración de RFCE calculada en pg/pocillo y en pg/célula. La concentración de RFCE calculada fue de aproximadamente 0,6 pg en cada célula A431.

55 La figura 4 muestra la detección de RFCE fosforilado en células A431, empleando un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal marcado con biotina contra el RFCE fosforilado como anticuerpo detector en un ensayo ELISA. (a) Curva de valoración celular con una serie de diluciones del anticuerpo de captura. (b) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo. La relación señal/ruido fue de 1,78 al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,0625 µg/ml.

60 La figura 5 muestra la detección de ErbB2 total en células SKBr3, empleando anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de ErbB2 como anticuerpo de captura y anticuerpo detector en un ensayo ELISA. (a) Valoración celular de ErbB2 total en células SKBr3. El rango de detección aproximado estaba comprendido entre 1.000 y 1,37 células. (b) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo. La relación señal/ruido fue de 2,71 al nivel celular 1,37, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 1 µg/ml.

65

La figura 6 muestra la detección de ErbB2 fosforilado en células SKBr3, usando un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de ErbB2 como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra ErbB2 fosforilado como anticuerpo detector en un ensayo ELISA. (a) Valoración celular de ErbB2 fosforilado en células SKBr3. El rango de detección aproximado estaba comprendido entre 500 y 5 células. (b) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo. La relación señal/ruido fue de 3,03 al nivel celular 5, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 1 µg/ml.

La figura 7 muestra la detección del total de proteína Erk2 fosforilada en células SKBr3, empleando anticuerpos monoclonales contra Erk2 como anticuerpo de captura y anticuerpo detector en un ensayo ELISA. (a) Detección del total de proteína Erk2, empleando anticuerpos monoclonales contra Erk2 como anticuerpo de captura y anticuerpo detector. (b) Detección de proteína Erk2 fosforilada, usando un anticuerpo monoclonal contra Erk2 como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra Erk2 fosforilada como anticuerpo detector. (c) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo. La relación señal/ruido fue de aproximadamente 3 al nivel celular 1,37 para la Erk2 total y fosforilada.

La figura 8 muestra la detección del total de RFCE en células A431, empleando anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpo de captura y anticuerpo detector en una micromatriz ELISA. (a) Curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células. La micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar RFCE en aproximadamente 1 - 10.000 células, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. (b) Curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura, la cual indicó que podía detectarse RFCE a partir de una célula (flecha). (c) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo a varias concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. La relación señal/ruido fue de 2,11 al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,0625 mg/ml (flecha).

La figura 9 muestra la detección de RFCE fosforilado en células A431, empleando un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra RFCE fosforilado como anticuerpo detector en una micromatriz ELISA. (a) Curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células. La micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar RFCE fosforilado en 1 - 10.000 células aproximadamente, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. (b) Curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura, la cual indicó que podía detectarse RFCE fosforilado a partir de una célula. (c) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo a varias concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. La relación señal/ruido fue de 1,33 al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,125 mg/ml (flecha).

La figura 10 muestra la detección de ErBb2 total en células SKBr3, empleando anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de ErBb2 como anticuerpo de captura y anticuerpo detector en una micromatriz ELISA. (a) Curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células. La micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar ErBb2 en 1 - 10.000 células aproximadamente, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. (b) Curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura, la cual indicó que podía detectarse ErBb2 a partir de una célula (flecha). (c) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo a varias concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. La relación señal/ruido fue de 15,27 al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,125 mg/ml (flecha).

La figura 11 muestra la detección de ErBb2 fosforilado en células SKBr3, usando un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de ErBb2 como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra ErBb2 fosforilado como anticuerpo detector en una micromatriz ELISA. (a) Curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células. La micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar ErBb2 en 1 - 10.000 células aproximadamente, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. (b) Curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura, la cual indicó que podía detectarse ErBb2 fosforilado a partir de una célula (flecha). (c) Tabla de relación señal/ruido (S/N) entre las células y el fondo a varias concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. La relación señal/ ruido fue de 5,45 al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,125 mg/ml (flecha).

La figura 12 muestra una comparación de la sensibilidad de la micromatriz ELISA como detector dual de proximidad frente a la micromatriz ELISA como detector individual. Se diluyeron células A431 desde 10.000 hasta 0,01 células. Los anticuerpos de captura se diluyeron en serie, desde 1 mg/ml hasta 0,004 mg/ml.

La figura 13 muestra la especificidad de la micromatriz ELISA como detector individual frente a la micromatriz ELISA como detector dual de proximidad. (a) Curvas de valoración de RFCE fosforilado en células A431 a diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en el formato de detector individual. Se observó un fondo muy elevado, debido a la falta de especificidad del anticuerpo de detección individual en este formato. (b) Curvas de valoración de RFCE fosforilado en células A431 a diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en el formato de detector

dual de proximidad. Se observó un fondo muy bajo, debido a la mayor especificidad obtenida al detectar en este formato la proximidad entre dos anticuerpos detectores.

La figura 14 muestra un ejemplo de forma de ejecución del formato de la micromatriz disponible, con el empleo de una serie de diluciones de anticuerpos de captura para determinar los estados de activación de varias moléculas transductoras de señales.

La figura 15 muestra los niveles de detección de Shc fosforilada en un análisis de valoración de células A431 estimuladas. La matriz disponible proporcionó simultáneamente información sobre la fosforilación de RFCE y HER2.

La figura 16 muestra las curvas de dilución de un anticuerpo de captura anti-RFCE. El rango dinámico de este ensayo fue superior a 5 logs. Cada curva individual tenía un rango dinámico de aproximadamente 2 logs, pero el rango dinámico se incrementó significativamente al combinar la información de las 6 curvas.

La figura 17 muestra un procedimiento de control de calidad para los oligonucleótidos conjugados de la presente invención. Se muestra el patrón de manchas de varias fracciones de GO-oligonucleótidos en la micromatriz. (b) Los anticuerpos conjugados Alexa 647-oligonucleótido tuvieron la mayor afinidad por los GO-oligonucleótidos en las fracciones 13-15.

La figura 18 muestra la formación de un complejo multiplexado de RFCE fosforilado que comprende un anticuerpo conjugado Alexa 647-oligonucleótido anti-RFCE hibridado con un glucosa oxidasa (GO)-oligonucleótido, un anticuerpo HRP conjugado anti RFCE fosforilado y un anticuerpo de captura de RFCE sujeto a un soporte sólido.

La figura 19 muestra la detección simultánea de RFCE total y fosforilado. (a) El RFCE total presente en 10.000 células se detectó mediante la señal de Alexa 647 generada por el anticuerpo conjugado Alexa 647-oligonucleótido anti-RFCE. El grado de fosforilación se detectó controlando la señal de Alexa 555 mediada por tiramida. (b) El RFCE total (t-RFCE) se detectó mediante un ensayo directo de fijación, partiendo de solo 10 células, y el RFCE fosforilado (p-RFCE) se detectó a partir de 1 célula. Con el método de amplificación de la señal de proximidad se detectaron  $10^5$  moléculas de p-RFCE. El límite de detección del p-RFCE se incrementó más de 100 veces usando el formato de ensayo de proximidad.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

### I. Introducción

La presente invención proporciona métodos según la reivindicación1 para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de varias moléculas transductoras de señales en células de rara circulación, empleando un sistema de ensayo basado en una matriz de anticuerpos. En algunas formas de ejecución los inmunoensayos multiplex de alto rendimiento de la presente invención pueden detectar el estado de activación de una o más moléculas transductoras de señales en células circulantes de un tumor sólido a nivel de una sola célula. De hecho moléculas transductoras de señales como las de RFCE se pueden detectar con una sensibilidad de aproximadamente 100 zeptomoles y un rango dinámico lineal de aproximadamente 100 zeptomoles hasta 100 femtomoles. Como tal, la detección unicelular del estado de activación de múltiples transductores de señales en células de rara circulación facilita el pronóstico y el diagnóstico del cáncer, así como el diseño de terapias selectivas personalizadas.

Entre las células de rara circulación se encuentran las células de un tumor sólido que han sido metastatizadas o micrometastatizadas a partir del mismo. Como ejemplos de algunas células circulantes de un tumor sólido cabe citar las células de tumores circulantes, las células madre cancerosas y las células que migran hacia un tumor (p.ej. por quimioatracción), tales como las células progenitoras endoteliales circulantes, las células endoteliales circulantes, las células mieloides proangiogénicas circulantes y las células dendríticas circulantes.

Las moléculas transductoras de señales que son de interés suelen extraerse poco después de haber aislado las células circulantes, a fin de preservar su estado de activación in situ, preferiblemente dentro de las primeras 24, 6 o 1 h y con mayor preferencia dentro de los primeros 30, 15 o 5 minutos, aproximadamente. Las células aisladas también se pueden incubar con uno o más factores de crecimiento, normalmente a concentraciones nanomolares hasta micromolares durante aproximadamente 1-30 minutos, para reavivar o estimular la activación de las moléculas transductoras de señales (véase p.ej. Irish y otros, Cell, 118:217-228 (2004)).

Tal como se explica aquí más detalladamente, con el fin de valorar potenciales terapias anticáncer para un paciente individual, las células aisladas se pueden incubar con uno o más fármacos anticáncer en dosis variables. Luego se puede estimular el factor de crecimiento durante unos minutos (p.ej. 1-5 minutos) o varias horas (p.ej. 1-6 horas). La activación diferencial de las vías de señalización con y sin fármacos anticáncer puede ayudar a elegir una terapia anticáncer adecuada, a la dosis idónea para cada paciente. Las células circulantes también pueden aislarse de una muestra de un paciente durante el tratamiento con fármacos anticáncer y estimularse con uno o más factores de crecimiento, para determinar si hay que implementar un cambio en la terapia. Los métodos de la presente invención

ayudan ventajosamente al médico clínico a administrar el fármaco anticáncer adecuado, en la dosis correcta y en el tiempo conveniente para cada paciente.

## II. Definiciones

5 Tal como se usan aquí, los siguientes términos tienen los significados adscritos, a no ser que se especifique lo contrario.

10 El término “cáncer” pretende incluir cualquier tipo de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células aberrantes. El término abarca todos los cánceres y estados neoplásicos conocidos, ya sean malignos, benignos, de tejido blando o sólido, y los cánceres de todas las fases y etapas, incluyendo los cánceres pre- y postmetastásicos. Como ejemplos de los diferentes tipos de cáncer cabe citar, sin limitarse a ellos, el cáncer de pulmón (p.ej. cáncer de pulmón de células no pequeñas); cánceres digestivos y gastrointestinales tales como cáncer colorrectal, tumores del estroma gastrointestinal, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de colon, 15 cáncer rectal, cáncer anal, cáncer de los conductos biliares, cáncer del intestino delgado y cáncer de estómago (gástrico), cáncer esofágico, cáncer de la vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de apéndice; cáncer de mama, cáncer ovárico; cáncer renal (p.ej. carcinoma de células renales); cáncer del sistema nervioso central; cáncer de piel; linfomas; coriocarcinomas; cánceres de cabeza y cuello; sarcomas osteogénicos; y cánceres de la sangre. Tal como se usa aquí, un “tumor” comprende una o más células cancerosas.

20 El término “analito” incluye cualquier molécula de interés, normalmente una macromolécula polipeptídica, cuya presencia, cantidad y/o identidad se determina. En ciertos casos el analito es un componente celular de células circulantes o de un tumor sólido, preferiblemente una molécula transductora de señales.

25 Tal como se usa aquí, el término “serie de dilución” pretende incluir una serie de concentraciones descendentes de una muestra (p.ej. lisado celular) o un reactivo (p.ej. anticuerpo) concretos. Una serie de dilución suele prepararse mezclando una cantidad medida de una concentración inicial de una muestra o reactivo con un diluyente (p.ej. un tampón de dilución), para crear una concentración más baja de la muestra o reactivo, y repitiendo el proceso las veces suficientes para obtener el número deseado de diluciones en serie. La muestra o 30 reactivo se puede diluir en serie al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 o 1000 veces, para producir una serie de diluciones que tengan al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 concentraciones descendentes de la muestra o reactivo. Por ejemplo, una serie de dilución que comprenda una dilución doble de un anticuerpo de captura a una concentración inicial de 1 mg/ml de reactivo se puede obtener mezclando una cantidad de la concentración inicial del anticuerpo de captura con igual cantidad de un tampón de dilución, para crear una concentración de 0,5 mg/ml del anticuerpo de captura y repitiendo el proceso para obtener concentraciones del anticuerpo de captura de 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml, etc.

40 Tal como se usa aquí, el término “rango dinámico superior” se refiere a la capacidad de un ensayo de la presente invención para detectar un analito específico en solo una célula o en miles de ellas. Por ejemplo, los inmunoensayos aquí descritos tienen un rango dinámico superior, porque detectan ventajosamente una molécula concreta de interés transductora de señales en aproximadamente 1-10.000 células (p.ej. en aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 o 10.000 células), empleando una serie de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura.

45 El término “molécula transductora de señales” o “transductor de señales” incluye proteínas y otras moléculas que llevan a cabo el proceso por el cual una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una respuesta que normalmente implica secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas en el interior de la célula. Como ejemplos de moléculas transductoras de señales cabe citar, sin limitarse a ellas, receptores de tirosina-cinasas tales como RFCE 50 (p.ej., RFCE/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (p.ej., PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor de insulina- receptor relacionado), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, LTK (leucocito tirosina cinasa), ALK (cinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, y RTK 106; no receptores de tirosina cinasas tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, y LIMK; componentes de la cascada de señalización de tirosina tales como Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc 55 (p66), PI3K, Ras (p.ej., K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p70 S6 cinasa, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 y paxillina; y combinaciones de las mismas.

60 Tal como se usa aquí, el término “células circulantes” incluye células que se han metastatizado o micrometastatizado a partir de un tumor sólido. Como ejemplos de células circulantes cabe mencionar, sin limitarse a ellas, las células de tumores circulantes, células madre cancerosas y/o células que migran hacia el tumor (p.ej. las células progenitoras endoteliales circulantes, las células endoteliales circulantes, las células mieloides proangiogénicas circulantes, las 65 células dendríticas circulantes, etc.).

Tal como se emplea aquí, el término “muestra” comprende cualquier muestra biológica obtenida de un paciente. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre entera, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (p.ej. células mononucleares de la sangre periférica), saliva, orina, excrementos (es decir, heces), esputos, líquido de lavado bronquioalveolar, lágrimas, líquido del pezón, linfa (p.ej. células tumorales diseminadas del nodo linfático), aspirado con aguja fina, cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (p.ej. de tejido tumoral) tal como una biopsia de un tumor (p.ej. biopsia con aguja) y extracto celulares de las mismas. En algunas formas de ejecución la muestra es sangre entera o un componente fraccionario de la misma como plasma, suero o un sedimento celular. En formas de ejecución preferidas la muestra se obtiene aislando células circulantes de un tumor sólido, de la sangre entera o de una fracción celular de la misma, empleando cualquier técnica conocida y preparando un extracto celular de las células circulantes. En otras formas de ejecución se trata de una muestra de tejido tumoral embebida en parafina y fijada en formol (FFPE), p.ej. de un tumor sólido del pulmón, del colon o del recto.

El término “sujeto” o “paciente” incluye normalmente humanos, pero también puede referirse a animales, como p.ej. otros primates, roedores, cánidos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

Una “matriz” o “micromatriz” comprende un juego diferenciado y/o una serie de dilución de anticuerpos de captura inmovilizados o sujetos sobre un soporte sólido, como por ejemplo vidrio (p.ej. una placa de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, bolas (p.ej. magnéticas, de poliestireno, etc.), papel, membranas (p.ej. de nylon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro substrato adecuado. Los anticuerpos de captura se inmovilizan o se fijan generalmente sobre el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (p.ej. enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En ciertos casos los anticuerpos de captura comprenden marcadores de captura que interactúan con agentes de captura sujetos al soporte sólido. Las matrices empleadas en los ensayos de la presente invención comprenden típicamente una serie de diferentes anticuerpos de captura y/o concentraciones de anticuerpo de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en distintas ubicaciones conocidas/direccionables.

El término “anticuerpo de captura” pretende incluir un anticuerpo inmovilizado que es específico (es decir, que se fija, es fijado por, o forma un complejo con) de uno o más analitos de interés en una muestra tal como un extracto celular de células circulantes de un tumor sólido. En formas de ejecución preferidas el anticuerpo de captura está sujeto sobre un soporte sólido en una matriz. Anticuerpos de captura adecuados para inmovilizar cualquier variedad de moléculas transductoras de señales se pueden adquirir de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO), y BD Biosciences (San Jose, CA).

Tal como se emplea aquí, el término “anticuerpo detector” incluye un anticuerpo con un marcador detectable que es específico (es decir, que se fija, es fijado por o forma un complejo con) de uno o más analitos de interés en una muestra. El término también engloba un anticuerpo que es específico para uno o más analitos de interés y que puede ser fijado por otra especie que lleve un marcador detectable. Como ejemplos de marcadores detectables cabe citar, sin limitarse a ellos, los de biotina/estreptavidina, ácido nucleico (p.ej. oligonucleótido), los químicamente reactivos, los marcadores fluorescentes, enzimáticos, radiactivos y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos idóneos para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquier variedad de moléculas transductoras de señales se pueden adquirir de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA). Como ejemplo no limitativo, pueden adquirirse de Santa Cruz Biotechnology anticuerpos fosfoespecíficos contra varias formas fosforiladas de moléculas transductoras de señales tales como RFCE, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK, PTEN, Raf y MEK.

El término “anticuerpo dependiente del estado de activación” incluye un anticuerpo detector específico (es decir, que se fija, es fijado por, o forma un complejo con) de un estado de activación particular de uno o más analitos de interés en una muestra. En formas de ejecución preferidas el anticuerpo dependiente del estado de activación detecta el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejo de uno o más analitos tales como moléculas transductoras de señales. En algunas formas de ejecución la fosforilación de miembros de la familia RFCE de receptores de tirosina-cinasas y/o la formación de complejos heterodímeros entre miembros de la familia RFCE se detecta mediante anticuerpos dependientes del estado de activación. Como ejemplos no limitativos de estados de activación (listados entre paréntesis) adecuados para la detección mediante anticuerpos dependientes del estado de activación cabe citar: RFCE (EGFRvIII, fosforilado (p-) RFCE, RFCE:Shc, ubiquitinado (u-) RFCE, p-EGFRvIII); ErbB2 (p85: truncado (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p85:Tr-p-ErbB2, Her2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:RFCE, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R: IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRA (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLCγ, VEGFR1: Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCγ, VEGFR2:Src, VEGFR2:sulfato de heparina, VEGFR2:VE-cadherina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tiel (p-Tiel); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFKB y/o IKB (p-IK (S32), p-NFKB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad:14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727));

Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); y paxillina (p-paxillina (Y118)).

5 El término “anticuerpo independiente del estado de activación” incluye un anticuerpo detector específico (es decir, que se fija, es fijado por, o forma un complejo con) de uno o más analitos de interés en una muestra, sin tener en cuenta su estado de activación. Por ejemplo, el anticuerpo independiente del estado de activación puede detectar tanto formas fosforiladas como no fosforiladas de uno o más analitos tales como una o más moléculas transductoras de señales.

10 El término “ácido nucleico” o “polinucleótido” incluye desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros, en forma mono- o bicatenaria como, por ejemplo, ADN y ARN. Los ácidos nucleicos incluyen aquellos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o uniones de cadena modificadas que son de tipo sintético, natural o no natural y poseen características de fijación análogas a las del ácido nucleico de referencia. Como ejemplos de tales análogos cabe citar, sin limitación, fósforotioatos, fósforoamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2'-O-metil-ribonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Si no está limitado específicamente, el término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales con características de fijación análogas a las del ácido nucleico de referencia. Si no se indica lo contrario, una secuencia concreta de ácido nucleico también engloba implícitamente variantes con modificaciones conservadoras del mismo y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente.

20 El término “oligonucleótido” se refiere a un oligómero o polímero monocatenario de ARN, ADN, híbrido ARN/ADN y/o un mimético del mismo. En ciertos casos los oligonucleótidos están compuestos por bases nucleicas, azúcares y uniones entre nucleósidos (esqueleto) naturales (o sea, sin modificar). En algunos otros casos los oligonucleótidos comprenden bases nucleicas, azúcares y/o uniones entre nucleósidos modificadas.

25 Tal como se emplea aquí, el término “motivo desapareado” o “región desapareada” se refiere a una porción de un oligonucleótido que no tiene el 100% de complementariedad con su secuencia complementaria. Un oligonucleótido puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones desapareadas, que pueden ser contiguas o estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más nucleótidos. Los motivos o regiones desapareadas pueden comprender un solo nucleótido o dos, tres, cuatro, cinco o más nucleótidos.

35 El término “condiciones estrictas de hibridación” se refiere a aquellas condiciones en las que un oligonucleótido se hibrida con su secuencia complementaria, pero no con otras secuencias. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y son distintas en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. En Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” [*Técnicas en bioquímica y biología molecular – hibridación con sondas nucleicas*, “Resumen de los principios de hibridación y estrategia de los ensayos con ácidos nucleicos”] (1993) se encuentra una extensa guía sobre la hibridación de ácidos nucleicos. En general las condiciones estrictas se eligen de manera que estén aproximadamente 5-10°C por debajo del punto de fusión térmico ( $T_m$ ) de la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración definidas) a la cual el 50% de las sondas complementarias de la diana se hibrida con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana se hallan en exceso, a  $T_m$ , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). También se pueden conseguir condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizantes como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el nivel de fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de nivel de fondo.

45 Los términos “sustancialmente idéntico” o “identidad sustancial”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que poseen un porcentaje especificado de nucleótidos iguales (es decir, al menos un 60%, preferiblemente al menos un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad a lo largo de una región especificada) cuando se cotejan y se alinean para ver la correspondencia máxima en una ventana de comparación o en una región designada como medida, empleando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Cuando el contexto lo indica, esta definición también se refiere análogamente al complemento de una secuencia. La identidad sustancial existe con preferencia en una región de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos de longitud.

50 El término “incubando” se usa como sinónimo de “poniendo en contacto” o “exponiendo” y no implica ningún tiempo concreto ni requisitos de temperatura, a no ser que se indique otra cosa.

### 60 III. Descripción de las formas de ejecución

La presente invención proporciona métodos según las reivindicaciones, en los cuales se pueden emplear matrices basadas en anticuerpos para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de varias moléculas transductoras de señales en células de rara circulación, con el fin de facilitar el pronóstico y el diagnóstico del cáncer y el diseño de terapias selectivas personalizadas.

## A. Matrices de anticuerpos

En una de sus vertientes, la presente invención usa una matriz de rango dinámico superior que comprende varias series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos en un extracto celular, en la cual los anticuerpos de captura están sujetos sobre un soporte sólido.

En algunas formas de ejecución el extracto celular comprende un extracto de células circulantes de un tumor sólido. Las células circulantes suelen aislarse de una muestra de un paciente, mediante el empleo de uno o más métodos de separación, incluyendo por ejemplo la separación inmunomagnética (véase p.ej. Racila y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth y otros, Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), la separación microfluídica (véase p.ej. Mohamed y otros, IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin y otros, Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (véase p.ej. Mancuso y otros, Blood, 97:3658-3661 (2001)), la centrifugación por gradiente de densidad (véase p.ej. Baker y otros, Clin. Cancer Res., 13: 4865-4871 (2003)), y los métodos de depleción (véase p.ej. Meye y otros, Int. J. Oncol., 21:521-530 (2002)).

En otras formas de ejecución la muestra del paciente incluye sangre entera, suero, plasma, orina, esputos, líquido de lavado bronquioalveolar, lágrimas, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva y/o aspirado con aguja fina. En algunos casos, de la muestra de sangre entera se separa una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, un sedimento celular). La fracción celular contiene normalmente glóbulos rojos, glóbulos blancos y/o células circulantes de un tumor sólido, como células tumorales circulantes (CTCs), células circulantes endoteliales (CECs), células progenitoras endoteliales circulantes (CEPCs), células madre cancerosas (CSCs) y combinaciones de las mismas. La fracción de plasma o suero contiene, entre otras cosas, ácidos nucleicos (p.ej. ADN, ARN) y proteínas liberadas por las células circulantes de un tumor sólido.

En algunos casos las células circulantes aisladas se pueden estimular *in vitro* con uno o más factores de crecimiento antes, durante y/o después de la incubación con uno o más fármacos anticáncer de interés. Entre los factores estimulantes del crecimiento cabe citar, sin limitarse a ellos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la heregulina (HRG), TGF- $\alpha$ , PIGF, la angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- $\alpha$ , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, las citocinas y similares. En otros casos, las células circulantes aisladas se pueden lisar, p.ej. después de la estimulación con factores de crecimiento y/o del tratamiento con fármacos anticáncer, a fin de producir el extracto celular (p.ej. lisado celular), usando cualquier técnica conocida en este campo. La lisis celular se inicia preferiblemente unos 1-360 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento y, con mayor preferencia, en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) a unos 1-5 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento y (2) a unos 30-180 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento. Como alternativa el lisado celular se puede conservar a -80°C hasta su uso.

En ciertas formas de ejecución el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina-cinasa, un agente antiproliferativo, un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico) y/o cualquier otro compuesto capaz de reducir o abolir el crecimiento incontrolado de células aberrantes como las de tipo canceroso. En algunas formas de ejecución las células circulantes aisladas son tratadas con un agente anti-señalización y/o con un agente antiproliferativo, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos.

Como ejemplos de agentes anti-señalización adecuados para usar en la presente invención cabe mencionar, sin limitación, anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>), alemtuzumab (Campath<sup>®</sup>), bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>), cetuximab (Erbix<sup>®</sup>), gemtuzumab (Mylotarg<sup>®</sup>), panitumumab (Vectibix<sup>®</sup>), rituximab (Rituxan<sup>®</sup>) y tositumomab (BEXXAR<sup>®</sup>); inhibidores de tirosina-cinasa tales como gefitinib (Iressa<sup>®</sup>), sunitinib (Sutent<sup>®</sup>), erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>), lapatinib (GW-572016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar<sup>®</sup>), imatinib mesilato (Gleevec<sup>®</sup>) y leflunomide (SU101); y combinaciones de los mismos.

Como ejemplos de agentes antiproliferativos cabe citar inhibidores de mTOR tales como sirolimus (rapamycin), temsirolimus (CCI-779) y everolimus (RAD001); inhibidores de Akt como 1 L6-hidroximetil-quirositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-*sn*-glicerocarbonato, 9-metoxi-2-metilelptincinio acetato, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-cloropfenoxazina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complejo Cu(II)Cl<sub>2</sub>), API-2, un péptido 15-mero derivado de los aminoácidos 10-24 del proto-oncogén TCL1 (Hirohara y otros, J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1, y los compuestos descritos en Kozikowski y otros, J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145 (2003) y Kau y otros, Cancer Cell, 4:463-476 (2003); y combinaciones de los mismos.

Como ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos cabe citar fármacos a base de platino (p.ej. oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iroplatino, satraplatino, etc.), agentes de alquilación (p.ej. ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucil, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), anti-metabolitos (p.ej. 5-fluorouracilo, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, flouxuridina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (p.ej. vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel, docetaxel, etc.), inhibidores de topoisomerasa (p.ej. irinotecano, topotecano,

amsacrina, etopósido (VP16), etopósido fosfato, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (p.ej. doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), y sales farmacéuticamente aceptables, estereoisómeros, derivados, análogos y combinaciones de los mismos.

5 En formas de ejecución preferidas uno o más de los analitos contenidos en el extracto celular comprenden varias moléculas transductoras de señales. Arriba se describen ejemplos de moléculas transductoras de señales de interés, incluyendo receptores y no receptores de tirosina-cinasa y/o componentes de la cascada de señalización de tirosina-cinasa.

10 En algunas formas de ejecución cada una de las series de dilución de anticuerpos de captura incluye una serie de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura. En ciertos casos los anticuerpos de captura van diluidos en serie al menos 2 veces (p.ej. 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces) para producir una serie de diluciones con un número (p.ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura puestas sobre la matriz. Sobre la matriz se colocan preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5 o 6 réplicas de cada dilución de anticuerpo de captura.

15 En otras formas de ejecución el soporte sólido comprende vidrio (p.ej. una placa de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membranas (p.ej. de nylon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En una forma de ejecución preferida los anticuerpos de captura están sujetos (p.ej. mediante interacciones covalentes o no covalentes) sobre placas de vidrio recubiertas con un polímero de nitrocelulosa, como por ejemplo las placas FAST<sup>®</sup>, que comercializa Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

20 Como ejemplo no limitativo la figura 14 representa una micromatriz direccionable que incluye varias series de dilución de anticuerpos de captura para determinar los estados de activación de RFCE, HER2, Shc, Erk y PI3K dirigiendo los anticuerpos de captura de cada serie de dilución hacia uno de estos analitos. Por tanto las matrices empleadas en el método de la presente invención comprenden varios anticuerpos de captura distintos en series de concentraciones descendentes (es decir, de diluciones en serie), donde los anticuerpos de captura se acoplan a la superficie del soporte sólido en distintas ubicaciones direccionables.

25 Un experto en la materia apreciará que la matriz puede tener cualquier configuración que permita detectar señales discretas de cada molécula transductora de señales activada. Así, por ejemplo, la matriz puede ser una línea o una cuadrícula de distintas regiones (p.ej. puntos o manchas) sobre la superficie soporte, cada una de ellas con un anticuerpo o agente de captura diferente (es decir, para fijar el marcador de captura presente en el anticuerpo de captura). La matriz puede estar configurada para usar en aquellos métodos en que los estados de activación de varias moléculas transductoras de señales se detectan en un solo ensayo multiplex. En varias formas de ejecución la variedad abarca al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más moléculas transductoras de señales.

#### 40 B. Ensayos de detección individual

El método de la reivindicación 1 para detectar el estado de activación de un determinado analito de interés en un extracto celular de células tumorales tales como las células circulantes de un tumor sólido es un ensayo multiplex de detección individual (es decir, de dos anticuerpos) de gran rendimiento que tiene un rango dinámico superior. Como ejemplo no limitativo, los dos anticuerpos empleados en el ensayo pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico del analito y (2) un anticuerpo detector específico de una forma activada del analito (es decir, anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz de detectar, por ejemplo, el estado de fosforilación, de ubiquitinación y/o de formación de complejo del analito. Como alternativa el anticuerpo detector comprende un anticuerpo independiente del estado de activación, que detecta la cantidad total del analito en el extracto celular. En general el anticuerpo independiente del estado de activación es capaz de detectar tanto la forma activada como las formas no activadas del analito.

La presente invención proporciona, según la reivindicación 1, un método para realizar un inmunoensayo multiplex de gran rendimiento que tiene un rango dinámico superior y consiste en:

- 55 (a) incubar un extracto celular con varias series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos del extracto celular, para formar varios analitos capturados, de manera que los anticuerpos de captura están sujetos sobre un soporte sólido;
- (b) incubar los analitos capturados con anticuerpos detectores específicos de los correspondientes analitos, para formar varios analitos capturados detectables;
- 60 (c) incubar los analitos capturados detectables con el primer y segundo miembros de un par de amplificación de señales, para generar una señal amplificada; y
- (d) detectar una señal amplificada generada desde el primer y segundo miembros del par de amplificación de señales.

65 En algunas formas de ejecución el extracto celular comprende un extracto de células circulantes de un tumor sólido. Las células circulantes se aíslan normalmente de una muestra del paciente, con el uso de métodos de separación conocidos del sector, incluyendo por ejemplo la separación inmunomagnética, la separación microfluídica, FACS, la

centrifugación por gradiente de densidad y los métodos de depleción. Los expertos en la materia conocerán otros métodos adecuados de separación y/o aislamiento de células circulantes.

En otras formas de ejecución la muestra del paciente incluye sangre entera, suero, plasma, orina, esputos, líquido de lavado bronquioalveolar, lágrimas, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva y/o aspirado con aguja fina. En algunos casos, de la muestra de sangre entera se separa una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, un sedimento celular). La fracción celular contiene normalmente glóbulos rojos, glóbulos blancos y/o células circulantes de un tumor sólido, tales como CTCs, CECs, CEPCs y/o CSCs. La fracción de plasma o suero contiene, entre otras cosas, ácidos nucleicos (p.ej. ADN, ARN) y proteínas liberadas por las células circulantes de un tumor sólido.

En algunos casos las células circulantes aisladas se pueden estimular *in vitro* con uno o más factores de crecimiento antes, durante y/o tras la incubación con uno o más fármacos anticáncer de interés. Los factores estimulantes de crecimiento están descritos arriba. En otros casos, las células circulantes aisladas se pueden lisar, p.ej. después de la estimulación con factores de crecimiento y/o del tratamiento con fármacos anticáncer, a fin de producir el extracto celular (p.ej. lisado celular), usando cualquier técnica conocida en este campo. Preferiblemente la lisis celular se inicia unos 1-360 minutos después de la estimulación con factores de crecimiento y, con mayor preferencia, en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) a unos 1-5 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento y (2) a unos 30-180 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento. Como alternativa el lisado celular se puede conservar a -80°C hasta su uso.

En ciertas formas de ejecución el fármaco anticáncer incluye un agente anti-señalización (es decir, un anticuerpo monoclonal, un inhibidor de tirosina-cinasa, etc.), un agente antiproliferativo, un agente quimioterapéutico y/o cualquier otro compuesto capaz de reducir o abolir el crecimiento incontrolado de células aberrantes como las de tipo canceroso. Arriba se proporcionan ejemplos de fármacos anticáncer correspondientes a estas clases generales de agentes terapéuticos.

En formas de ejecución preferidas uno o más analitos del extracto celular incluyen varias moléculas transductoras de señales. Arriba se describen ejemplos de moléculas transductoras de señales de interés, incluyendo sin limitación receptores de tirosina-cinasa, no receptores de tirosina-cinasa y/o componentes de la cascada de señalización de tirosina-cinasa.

En algunas formas de ejecución cada serie de dilución de los anticuerpos de captura comprende una serie de concentraciones descendentes del anticuerpo de captura. En ciertos casos los anticuerpos de captura van diluidos en serie al menos 2 veces (p.ej. 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces) para producir una serie de diluciones con un número (p.ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura puestas sobre la matriz. Sobre la matriz se colocan preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5 o 6 réplicas de cada dilución de anticuerpo de captura.

En otras formas de ejecución el soporte sólido comprende vidrio (p.ej. una placa de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membranas (p.ej. de nylon, nitrocelulosa PVDF, etc.), haces de fibras o cualquier otro substrato adecuado. En una forma de ejecución preferida los anticuerpos de captura están sujetos sobre placas de vidrio recubiertas con un polímero de nitrocelulosa, como por ejemplo las placas FAST<sup>®</sup> (de Whatman Inc. (Florham Park, NJ)).

En ciertos casos el extracto celular se incuba con anticuerpos de captura ya sujetos sobre un soporte sólido. En algunos otros casos el extracto celular se incuba primero con anticuerpos de captura en solución y luego se pone en contacto con un soporte sólido para inmovilizar los anticuerpos de captura, p.ej. mediante marcadores de captura presentes en el anticuerpo de captura, que interactúan con agentes de captura sujetos al soporte sólido.

En algunas formas de ejecución los anticuerpos detectores se incuban con analitos que se fijan a anticuerpos de captura en solución o sujetos a un soporte sólido. En ciertos casos el extracto celular que contiene varios analitos se incuba primero con los anticuerpos detectores en solución y luego se pone en contacto con anticuerpos de captura en solución o sujetos a un soporte sólido. En algunos otros casos el extracto celular que contiene varios analitos se incuba primero con anticuerpos de captura y anticuerpos detectores en solución y luego se pone en contacto con un soporte sólido para inmovilizar los complejos anticuerpo-analito, p.ej. mediante marcadores de captura presentes en los anticuerpos de captura o mediante anticuerpos detectores que interactúan con agentes de captura sujetos al soporte sólido.

En algunos casos los anticuerpos detectores incluyen anticuerpos independientes del estado de activación, que son útiles para detectar la cantidad total de uno o más analitos en el extracto celular. Como ejemplo no limitativo, los anticuerpos independientes del estado de activación pueden detectar tanto formas fosforiladas como no fosforiladas de una o más moléculas transductoras de señales. En algunos otros casos los anticuerpos detectores comprenden anticuerpos dependientes del estado de activación, que sirven para detectar el estado de activación de uno más de los analitos contenidos en el extracto celular. Preferiblemente los anticuerpos dependientes del estado de activación detectan el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejo de una o más moléculas transductoras de señales.

Los anticuerpos de captura y los anticuerpos detectores se seleccionan normalmente de manera que se minimice su concurrencia para la fijación del analito (es decir, ambos anticuerpos, de captura y detección, pueden fijar al mismo tiempo sus correspondientes moléculas transductoras de señales.

En una forma de ejecución preferida los anticuerpos detectores comprenden un primer miembro de un par de fijación (p.ej. biotina) y el primer miembro del par amplificador de señal comprende un segundo miembro del par de fijación (p.ej. estreptavidina). Los miembros del par de fijación se pueden acoplar directa o indirectamente a los anticuerpos detectores o al primer miembro del par amplificador de señal, usando métodos bien conocidos del sector. El primer miembro del par amplificador de señal es una peroxidasa (p.ej. peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloro-peroxidasa, citocromo c peroxidasa, eosinofil peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa tiroidea, deiodinasa, etc.) y el segundo miembro del par amplificador de señal es un reactivo de tiramida (p.ej. biotina-tiramida). En estos casos la señal amplificada es generada por la oxidación del reactivo de tiramida con peroxidasa, para producir una tiramida activada en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La tiramida activada se detecta directamente o tras la adición de un reactivo detector de señales como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Como ejemplos de fluoróforos adecuados para usar en la presente invención cabe citar, sin limitarse a ellos, un colorante Alexa Fluor<sup>®</sup> (p.ej. Alexa Fluor<sup>®</sup> 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde Oregon<sup>®</sup>, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetrarrodamina (TRITC), un colorante CyDye<sup>®</sup> fluor (p.ej. Cy2, Cy3, Cy5) y equivalentes. El marcador de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente al fluoróforo o a la peroxidasa usando métodos bien conocidos del sector. Como ejemplos no limitativos de reactivos cromogénicos adecuados para emplear en la presente invención cabe mencionar 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

El experto en la materia apreciará que, además de anticuerpos, se pueden emplear otros componentes del par de fijación para inmovilizar y/o detectar uno o más analitos de un extracto celular, conforme a los ensayos de detección individual aquí descritos. Como ejemplos no limitativos de tales componentes del par de fijación cabe citar ligandos o receptores del analito, substratos del analito, dominios de fijación (p.ej. PTB, SH2, etc.), aptámeros y similares.

#### C. Ensayos de detección dual de proximidad

En otro aspecto, el método de la reivindicación 1 para detectar el estado de activación de un analito particular de interés en un extracto celular de células tumorales - como las células circulantes de un tumor sólido - es un ensayo multiplex de proximidad (es decir, con tres anticuerpos) de gran rendimiento, con rango dinámico superior. Como ejemplo no limitativo, los tres anticuerpos empleados en el ensayo de proximidad comprenden: (1) un anticuerpo de captura específico del analito; (2) un anticuerpo detector específico de una forma activada del analito (es decir, un anticuerpo dependiente del estado de activación); y (3) un anticuerpo detector de la cantidad total del analito (es decir, un anticuerpo independiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz de detectar, por ejemplo, el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejo del analito. En general el anticuerpo independiente del estado de activación es capaz, de detectar tanto las formas activadas como las formas no activadas del analito.

La presente invención proporciona un método según la reivindicación 1, para realizar un inmunoensayo multiplex de gran rendimiento y rango dinámico superior, que consiste en:

(a) incubar un extracto celular con varias series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos contenidos en el extracto celular, para formar varios analitos capturados, estando los anticuerpos de captura sujetos sobre un soporte sólido;

(b) incubar los analitos capturados con anticuerpos detectores específicos de los correspondientes analitos, para formar varios analitos capturados detectables, de modo que los anticuerpos detectores incluyen:

(1) varios anticuerpos independientes del estado de activación marcados con glucosa oxidasa y (2) varios anticuerpos dependientes del estado de activación marcados con un primer miembro de un par amplificador de la señal que es peroxidasa,

de tal modo que la glucosa oxidasa genera peróxido de hidrógeno, que se canaliza y reacciona con el primer miembro de un par amplificador de la señal;

(c) incubar los analitos capturados detectables con un segundo miembro del par amplificador de la señal, para generar una señal amplificada; y

(d) detectar la señal amplificada generada por el primer y segundo miembros del par amplificador de la señal.

La figura 1 explica un ejemplo de ensayo de proximidad en el cual un analito está fijado a un anticuerpo de captura y a dos anticuerpos detectores (es decir, un anticuerpo independiente del estado de activación y un anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo de captura 1 y el anticuerpo independiente del estado de activación 2 fijan el analito 6 independientemente de su estado de activación. El anticuerpo dependiente del estado de activación 3 fija el analito dependiendo de su estado de activación (es decir, el anticuerpo dependiente del estado de activación solo fijará una forma activada del analito que lleva un resto fosforilado). El anticuerpo independiente

del estado de activación está marcado con un fragmento facilitador (designado M1, 4) y el anticuerpo dependiente del estado de activación con un primer miembro de un par amplificador de la señal (designado M2, 5). La fijación de ambos anticuerpos detectores al analito aporta glucosa oxidasa, que es el fragmento facilitador, con proximidad suficiente (representada por el área de puntos 7) al primer miembro de un par amplificador de la señal, de manera que una señal generada por el fragmento facilitador se puede canalizar al primer miembro de un par amplificador de la señal, produciendo una señal detectable y/o amplificable. En el estado técnico se conocen varios métodos para la canalización de proximidad, incluyendo, por ejemplo, FRET, fluorescencia resuelta en el tiempo-FRET, LOCI, etc. Una ventaja de la canalización de proximidad, tal como se usa en los métodos de la presente invención, es que se genera una señal individual detectable solo para aquellos analitos que se han fijado a los tres anticuerpos, lo cual aumenta la especificidad del ensayo, reduce el nivel de fondo y simplifica la detección.

En algunas formas de ejecución el extracto celular comprende un extracto de células circulantes de un tumor sólido. Las células circulantes suelen aislarse de una muestra de paciente, empleando uno o más métodos de separación conocidos del estado técnico, por ejemplo la separación inmunomagnética, la separación microfluidica, FACS, la centrifugación por gradiente de densidad y los métodos de depleción

En otras formas de ejecución la muestra del paciente comprende sangre entera, suero, plasma, orina, esputos, líquido de lavado bronquioalveolar, lágrimas, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva y/o muestra aspirada con aguja fina. En algunos casos, de la muestra de sangre entera se separa una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, un sedimento celular). La fracción celular contiene normalmente glóbulos rojos, glóbulos blancos y/o células circulantes de un tumor sólido, tales como CTCs, CECs, CEPCs y/o CSCs. La fracción de plasma o suero contiene normalmente, entre otras cosas, ácidos nucleicos (p.ej. ADN, ARN) y proteínas liberadas por las células circulantes de un tumor sólido.

En algunos casos las células circulantes aisladas se pueden estimular *in vitro* con uno o más factores de crecimiento antes, durante y/o después de la incubación con uno o más fármacos anticáncer de interés. Los factores estimulantes del crecimiento están descritos arriba. En otros casos, las células circulantes aisladas se pueden lisar, p.ej. después de la estimulación con factores de crecimiento y/o del tratamiento con fármacos anticáncer, a fin de producir el extracto celular (p.ej. lisado celular), usando cualquier técnica conocida en este campo. La lisis celular se inicia preferiblemente unos 1-360 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento y, con mayor preferencia, en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) a unos 1-5 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento y (2) a unos 30-180 minutos tras la estimulación con factores de crecimiento. Como alternativa el lisado celular se puede conservar a -80°C hasta su uso.

En ciertas formas de ejecución el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (p.ej. un anticuerpo monoclonal, un inhibidor de tirosina-cinasa, etc.), un agente antiproliferativo, un agente quimioterapéutico y/o cualquier otro compuesto capaz de reducir o abolir el crecimiento incontrolado de células aberrantes como las de tipo canceroso. Arriba se dan ejemplos de fármacos anticáncer específicos, que corresponden a esta clase general de agentes quimioterapéuticos.

En formas de ejecución preferidas, el o los analitos contenidos en el extracto celular comprenden varias moléculas transductoras de señales. Más arriba se describen ejemplos interesantes de moléculas transductoras de señales, incluyendo, sin limitación, receptores de tirosina-cinasa, no receptores de tirosina-cinasa y/o componentes de la cascada de señalización de tirosina-cinasa.

En algunas formas de ejecución cada serie de dilución de los anticuerpos de captura comprende una serie de concentraciones descendentes del anticuerpo de captura. En ciertos casos los anticuerpos de captura van diluidos en serie al menos 2 veces (p.ej. 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces) para producir una serie de diluciones con un número (p.ej. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura puestas sobre la matriz. Sobre la matriz se colocan preferiblemente al menos 2, 3, 4, 5 o 6 réplicas de cada dilución de anticuerpo de captura.

En otras formas de ejecución el soporte sólido comprende vidrio (p.ej. una placa de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membranas (p.ej. de nylon, nitrocelulosa PVDF, etc.), haces de fibras o cualquier otro substrato adecuado. En una forma de ejecución preferida los anticuerpos de captura están sujetos sobre placas de vidrio recubiertas con un polímero de nitrocelulosa, como por ejemplo las placas FAST<sup>®</sup> (de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

En algunos casos el extracto celular se incuba con anticuerpos de captura que ya están sujetos sobre un soporte sólido. En algunos otros casos el extracto celular se incuba primero con anticuerpos de captura en solución y luego se pone en contacto con un soporte sólido, para inmovilizar los analitos capturados, p.ej. mediante marcadores de captura presentes en los anticuerpos de captura que interactúan con agentes de captura sujetos al soporte sólido.

En algunas formas de ejecución los anticuerpos detectores se incuban con analitos fijados a anticuerpos de captura que se hallan en solución o sujetos sobre un soporte sólido. En algunos casos el extracto celular que comprende varios analitos se incuba primero con los anticuerpos detectores en solución y después se pone en contacto con

anticuerpos de captura en solución o sujetos a un soporte sólido. En otros casos el extracto celular que comprende varios analitos se incuban primero con anticuerpos de captura y anticuerpos detectores en solución y luego se pone en contacto con un soporte sólido, para inmovilizar los complejos anticuerpo-analito, p.ej. mediante marcadores de captura presentes en anticuerpos de captura o en anticuerpos detectores, que interactúan con agentes de captura sujetos al soporte sólido. Antes de la etapa de detección, los complejos inmovilizados se pueden lavar para eliminar los anticuerpos no complejados; los complejos lavados se pueden liberar sucesivamente de la superficie soporte y la canalización de proximidad de cada analito ensayado se puede detectar mediante un método adecuado, tal como se describe aquí.

En las formas de ejecución en que la superficie soporte comprende agentes de captura sujetos en una matriz, la etapa de incubación puede consistir en poner en contacto el extracto celular que contiene varios analitos en solución con los anticuerpos de captura y de detección, usando un exceso de los tres anticuerpos para forzar que la reacción sea completa. En una variación del método los complejos anticuerpo-analito resultantes se fijan a una fase sólida y se lavan para eliminar los anticuerpos no fijados. Haciendo referencia a la figura 2, el anticuerpo de captura 1 puede llevar un marcador de captura 10. Los complejos se fijan a una fase sólida 12 mediante un agente de captura 11 que está adherido a la fase sólida y se une al marcador de captura, inmovilizando el complejo. El complejo inmovilizado se lava con un tampón adecuado y luego se libera de la fase sólida, añadiendo el agente de liberación 13. El agente de liberación puede funcionar por cualquier mecanismo que libere el complejo lavado. En una forma de ejecución el marcador de captura tiene un sitio escindible que es reconocido y cortado por el agente de liberación. En otra forma de ejecución, representada en la figura 2, el agente de liberación compite con el marcador de captura por la fijación al agente de captura. Por ejemplo, el agente de captura puede ser un primer oligonucleótido que se hibride con un oligonucleótido parcialmente complementario (es decir, el marcador de captura) fijado al anticuerpo de captura y el agente de liberación puede ser un oligonucleótido totalmente complementario del agente de captura, dando como resultado el desplazamiento de la hebra y el desprendimiento del complejo lavado de la fase sólida. Otros ejemplos de marcadores de captura/agentes de captura/agentes de liberación adecuados para el uso incluyen, sin limitarse a ellos, 2,4-dinitrofenol (DNP)/anticuerpo anti-DNP/2,4-DNP lisina; T2/anticuerpo anti-T3 /T3; ouabaina/anticuerpo anti-digoxina/digoxina; y detiobiotina/estreptavidina/biotina (véase p.ej. Ishikawa y otros, *J. Clin. Lab Anal.*, 12:98-107 (1998)).

Una vez liberado de la fase sólida, el complejo lavado (1) se pone en contacto con una superficie soporte que tiene moléculas de captura sujetas en una matriz, para fijar específicamente marcadores de captura en el anticuerpo de captura, o (2) se disocia y los anticuerpos detectores disociados se ponen en contacto con una superficie soporte que comprende agentes de captura para fijar específicamente marcadores de captura en los anticuerpos detectores. La figura 2 representa la forma de ejecución en la cual el complejo lavado se disocia y los anticuerpos detectores disociados se ponen en contacto con la superficie soporte 14. La superficie soporte comprende varias moléculas de captura sujetas en una matriz "direccionable" o de "código Zip". Cada región distinta de la matriz tiene un solo agente de captura 9 que fija específicamente el marcador de captura 8 presente en el anticuerpo detector independiente del estado de activación 2 o en el anticuerpo detector dependiente del estado de activación 3, reteniendo y organizando en la matriz los anticuerpos detectores marcados. En una forma de ejecución preferida los agentes de captura y los marcadores de captura son oligonucleótidos que se hibridan específicamente entre sí. Las matrices direccionables que comprenden moléculas de captura oligonucleótidas son bien conocidas del estado técnico (véase p.ej. Keramas y otros, *Lab Chip*, 4:152-158 (2004); Delrio-Lafreniere y otros, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 48:23-31 (2004)).

La presencia de los anticuerpos detectores en cada región distinta de la matriz se puede detectar de manera directa o indirecta con glucosa oxidasa, que es el fragmento facilitador (designado M1, 4), o con un primer miembro de un par amplificador de la señal, que es una peroxidasa (designado M2, 5). Como ejemplos de fragmentos que pueden detectarse directamente cabe mencionar los fluoróforos, los cromóforos, el oro coloidal, el látex coloreado, etc. En una forma de ejecución, ambos fragmentos son fluoróforos seleccionados independientemente. Se puede emplear cualquier par de fluoróforos que proporcione una lectura distinguible, estando muy cerca entre sí, como por ejemplo Cy3/Cy5, Cy5/ficoeritrina y análogos. Alternativamente, si se emplea una matriz direccionable de oligonucleótidos, ambos fragmentos pueden ser el mismo fluoróforo asignado a diferentes códigos zip. Se puede usar la microscopía confocal de barrido por láser para detectar fragmentos fluoróforos adheridos a la matriz. En aquellos ensayos en que los complejos se liberan de la matriz antes de la detección, por ejemplo en ensayos de desplazamiento de hebras, los métodos adecuados para detectar fragmentos fluoróforos incluyen la fluorescencia inducida por láser confocal de flujo capilar, la nano-HPLC, la electroforesis microcapilar, etc.

En algunas formas de ejecución los anticuerpos independientes del estado de activación comprenden además un fragmento detectable. En tales casos la cantidad del fragmento detectable está relacionada con la cantidad de uno o más analitos en el extracto celular. Como ejemplos de fragmentos detectables cabe mencionar, sin limitarse a ellos, marcadores fluorescentes, marcadores químicamente reactivos, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos y similares. El fragmento detectable es preferiblemente un fluoróforo tal como un colorante Alexa Fluor<sup>®</sup> (p.ej. Alexa Fluor<sup>®</sup> 647), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde Oregon<sup>®</sup>; rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraarrodamina (TRITC), un colorante CyDye<sup>®</sup> fluor (p.ej. Cy2, Cy3, Cy5) y equivalentes. El fragmento detectable se puede acoplar directa o indirectamente a los anticuerpos independientes del estado de activación, empleando métodos bien conocidos del estado técnico.

En ciertos casos los anticuerpos independientes del estado de activación se marcan directamente con el fragmento facilitador glucosa oxidasa. El fragmento facilitador se puede acoplar a los anticuerpos independientes del estado de activación empleando métodos bien conocidos del estado técnico. El fragmento facilitador utilizable en la presente invención es capaz de generar un agente oxidante que se canaliza (es decir, se dirige) hacia otra molécula próxima al fragmento facilitador y reacciona con ella (es decir, se fija, es fijado por o forma un complejo con). El fragmento facilitador es glucosa oxidasa. El agente oxidante es peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). En presencia de un sustrato apropiado (p.ej. glucosa) el fragmento facilitador (es decir, glucosa oxidasa) genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )) que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par amplificador de la señal (es decir, una peroxidasa, por ejemplo peroxidasa de rábano picante (HRP)) cuando los dos fragmentos están cerca uno de otro.

En algunos otros casos los anticuerpos independientes del estado de activación se marcan indirectamente con el fragmento facilitador por hibridación entre un oligonucleótido conector conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conector conjugado con el fragmento facilitador. Los oligonucleótidos conectores se pueden acoplar al fragmento facilitador o a los anticuerpos independientes del estado de activación, empleando métodos bien conocidos del estado técnico. En algunas formas de ejecución el conector oligonucleótido conjugado con el fragmento facilitador es complementario al 100% del conector oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación. En otras formas de ejecución, el par de oligonucleótidos conectores comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones de apareamiento erróneo, p.ej. tras una hibridación en condiciones rigurosas. Un experto en la materia apreciará que los anticuerpos independientes del estado de activación que son específicos de diferentes analitos pueden conjugarse con el mismo oligonucleótido conector o con oligonucleótidos conectores distintos.

La longitud de los oligonucleótidos conectores que están conjugados con el fragmento facilitador o los anticuerpos independientes del estado de activación puede variar. En general la secuencia conectora puede tener una longitud de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos. Suelen generarse secuencias aleatorias de ácidos nucleicos para el acoplamiento. Como ejemplo no limitativo puede decirse que una biblioteca de conectores oligonucleótidos tiene tres dominios contiguos distintos: un dominio espaciador, un dominio distintivo y un dominio de conjugación. Preferentemente, los oligonucleótidos conectores están indicados para un acoplamiento eficiente sin destruir la función del fragmento facilitador o de los anticuerpos independientes del estado de activación con los que están conjugados.

Las secuencias de oligonucleótidos conectores se pueden indicar para evitar o minimizar cualquier formación de estructuras secundarias bajo diversas condiciones de ensayo. Normalmente, las temperaturas de fusión de cada segmento del conector se controlan cuidadosamente, para permitir su participación en los procedimientos globales de ensayo. En general el rango de temperaturas de fusión del segmento de la secuencia conectora no es superior a  $5^\circ C$ . Para analizar cada uno de los tres dominios de cada conector se pueden usar algoritmos computacionales (p.ej. OLIGO 6.0) que determinen la temperatura de fusión, la estructura secundaria y la estructura de horquilla a unas concentraciones iónicas definidas. Las secuencias combinadas globales también se pueden analizar para ver sus características estructurales y su compatibilidad con otras secuencias de oligonucleótidos conectores, p.ej. si se hibridan en condiciones rigurosas con un conector oligonucleótido complementario.

La región espaciadora del conector oligonucleótido ofrece una separación adecuada entre el dominio de conjugación y el sitio de reticulación del oligonucleótido. El dominio de conjugación funciona uniendo moléculas marcadas con una secuencia oligonucleótida conectora complementaria del dominio de conjugación, mediante hibridación por ácido nucleico. La hibridación mediada por ácido nucleico se puede efectuar antes o después de la formación del complejo anticuerpo-analito (es decir, antígeno), proporcionando un formato de ensayo más flexible. Al contrario que muchos métodos de conjugación de anticuerpos, la unión de oligonucleótidos relativamente pequeños a anticuerpos u otras moléculas tiene un impacto mínimo sobre la afinidad específica de los anticuerpos hacia su analito diana o en la función de las moléculas conjugadas.

En algunas formas de ejecución la secuencia del dominio distintivo del oligonucleótido conector se puede usar en ensayos multiplex complejos de proteínas. Se pueden conjugar múltiples anticuerpos a conectores oligonucleótidos con secuencias distintivas diferentes. En los inmunoensayos multiplex se pueden usar secuencias oligonucleótidas indicadoras, marcadas con sondas adecuadas, para detectar la hibridación cruzada entre anticuerpos y antígenos en el formato de ensayo multiplex.

Los oligonucleótidos conectores se pueden conjugar con anticuerpos u otras moléculas mediante varios métodos. Por ejemplo, los oligonucleótidos conectores se pueden sintetizar con un grupo tiol en el extremo 5' o 3'. El grupo tiol se puede desproteger usando agentes reductores (p.ej. TCEP-HCl) y los conectores resultantes se pueden purificar usando una columna centrifugadora de desalinización. Los oligonucleótidos conectores desprotegidos resultantes se pueden conjugar con las aminas primarias de anticuerpos o de otros tipos de proteínas, empleando reticuladores heterobifuncionales como SMCC. Como alternativa, los grupos 5'-fosfato de los oligonucleótidos se pueden tratar con carbodiimida hidrosoluble EDC para formar fosfato-ésteres y luego acoplarse a moléculas aminadas. En algunos casos el diol en el resto 3'-ribosa se puede oxidar a grupos aldehído y luego puede conjugarse con los grupos amino de anticuerpos u otros tipos de proteínas, mediante aminación reductora. En algunos otros casos el oligonucleótido

conector se puede sintetizar con una modificación de biotina en el extremo 3' o 5' y luego conjugar con moléculas marcadas con estreptavidina.

Los oligonucleótidos conectores se pueden sintetizar usando varias técnicas conocidas en el sector, como las que se describen en Usman y otros, *J. Am. Chem. Soc.*, 109:7845 (1987); Scaringe y otros, *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott y otros, *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); y Wincott y otros, *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). En la síntesis de oligonucleótidos se utilizan generalmente grupos protectores y grupos de acoplamiento corrientes de ácidos nucleicos, tales como dimetoxitriilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Los expertos en la materia conocen reactivos de síntesis de oligonucleótidos, métodos de desprotección de ácidos nucleicos y métodos de purificación de ácidos nucleicos adecuados.

En algunos casos los anticuerpos dependientes del estado de activación se marcan directamente con el primer miembro del par amplificador de la señal. El miembro del par amplificador de la señal se puede acoplar a los anticuerpos dependientes del estado de activación, usando métodos bien conocidos del estado técnico. En algunos otros casos los anticuerpos dependientes del estado de activación se marcan indirectamente con el primer miembro del par amplificador de la señal mediante la unión entre un primer miembro de un par amplificador de fijación conjugado con los anticuerpos dependientes del estado de activación y un segundo miembro del par de fijación conjugado con el primer miembro del par amplificador de la señal. Los miembros del par de fijación (p.ej. biotina/estreptavidina) se pueden acoplar al miembro del par amplificador de la señal o a los anticuerpos dependientes del estado de activación, usando métodos bien conocidos del estado técnico. Como miembros del par amplificador de la señal cabe citar peroxidasa tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP).

Los anticuerpos de captura, los anticuerpos independientes del estado de activación y los anticuerpos dependientes del estado de activación se eligen típicamente de modo que la competencia entre ellos para la fijación del analito sea mínima (es decir, todos los anticuerpos pueden fijar simultáneamente sus correspondiente moléculas transductoras de señales).

En un ejemplo de canalización de proximidad el fragmento facilitador es glucosa oxidasa (GO) y el primer miembro del par amplificador de la señal es peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato como glucosa, genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)). Si la HRP se halla cerca de la canalización de la GO, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la GO se canaliza hacia la HRP y se compleja con ella para formar un complejo HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que en presencia del segundo miembro del par amplificador de la señal (es decir, un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico tal como tiramida (p.ej. biotina-tiramida), ácido homovalínico o ácido 4-hidroxifenilacético) genera una señal amplificada. Los métodos de uso de GO y HRP en un ensayo de proximidad están descritos p.ej. en Langry y otros, U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999). Cuando se usa biotina-tiramida como segundo miembro del par amplificador de la señal, el complejo HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida la tiramida, generando un radical de tiramida reactivo que fija covalentemente restos nucleófilos cercanos. La tiramida activada se detecta directamente o tras la adición de un reactivo detector de señales como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Como ejemplos de fluoróforos adecuados para utilizar en la presente invención cabe mencionar, sin limitarse a ellos, un colorante Alexa Fluor<sup>®</sup> (p.ej. Alexa Fluor<sup>®</sup> 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Verde Oregon<sup>®</sup>; rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraarodamina (TRITC), un colorante CyDye<sup>®</sup> fluor (p.ej. Cy2, Cy3, Cy5) y equivalentes. El marcador de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente al fluoróforo o a la peroxidasa, usando métodos bien conocidos del sector. Como ejemplos no limitativos de reactivos cromogénicos adecuados para emplear en la presente invención cabe mencionar 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

Un experto en la materia apreciará que, además de anticuerpos, se pueden emplear otros componentes del par de fijación para inmovilizar y/o detectar uno o más analitos de un extracto celular, según los ensayos de proximidad (es decir, tres anticuerpos) aquí descritos. Como ejemplos no limitativos de tales componentes del par de fijación cabe citar ligandos o receptores del analito, sustratos del analito, dominios de fijación (p.ej. PTB, SH2, etc.), aptámeros y similares.

#### D. Kits

Se revelan kits para realizar los métodos arriba descritos con matrices basadas en anticuerpos, incluyendo: (a) una serie de dilución de varios anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido y (b) varios anticuerpos detectores (p.ej. anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos los kits también pueden contener instrucciones para su empleo en la detección de los estados de activación de varias moléculas transductoras de señales de células circulantes de un tumor sólido. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales arriba descritos para llevar a cabo los métodos específicos de la presente invención, como, por ejemplo, el primer y segundo miembros del par amplificador de la señal, reactivos de amplificación de la señal de tiramida, sustratos para el fragmento facilitador, tampones de lavado, agentes de captura/liberación, etc.

## IV. Estructura de las matrices de anticuerpos

Se revelan matrices de anticuerpos para detectar el estado de activación de varias moléculas transductoras de señales en un extracto celular de células circulantes de un tumor sólido mediante el uso de una serie de dilución de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido. Las matrices usadas en los métodos de la presente invención comprenden típicamente varios anticuerpos de captura diferentes - en un intervalo de concentraciones de anticuerpo de captura - acoplados a la superficie de un soporte sólido en distintas ubicaciones direccionables.

El soporte sólido puede comprender cualquier substrato adecuado para inmovilizar proteínas. Como ejemplos de soportes sólidos cabe citar, sin limitarse a ellos, vidrio (p.ej. una placa de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas (p.ej. perlas magnéticas, de poliestireno), papel, membranas, haces de fibras, geles, metal, cerámica y análogos. Las membranas de nylon (Biotrans<sup>®</sup>, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), nitrocelulosa (Protran<sup>®</sup>, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) y PVDF (Immobilon<sup>™</sup>, Millipore Corp. (Billerica, MA)) son adecuadas para emplear como soportes sólidos en las matrices de la presente invención. Los anticuerpos de captura están inmovilizados preferiblemente sobre placas de vidrio recubiertas con un polímero de nitrocelulosa, p.ej. placas FAST<sup>®</sup>, que comercializa Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Los aspectos particulares deseables del soporte sólido comprenden la capacidad de fijar grandes cantidades de anticuerpos de captura, la capacidad de fijar anticuerpos de captura con la menor desnaturalización y la incapacidad de fijar otras proteínas. Otro aspecto adecuado es que el soporte sólido haga un mínimo efecto de "mecha" al aplicar sobre él soluciones de anticuerpos que contienen anticuerpos de captura. Un soporte sólido con mínimo efecto de mecha permite aplicar sobre el mismo pequeños alícuotas de solución de anticuerpos de captura y obtener manchas pequeñas y definidas del anticuerpo de captura inmovilizado.

Los anticuerpos de captura se inmovilizan directa o indirectamente (p.ej. mediante marcadores de captura) sobre el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (p.ej. enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En algunas formas de ejecución los anticuerpos de captura se unen covalentemente al soporte sólido, empleando un reticulador homobifuncional o heterobifuncional en métodos y condiciones estándar. Pueden adquirirse reticuladores adecuados a suministradores comerciales como p.ej. Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Los métodos para generar las matrices incluyen, sin limitarse ellas, cualquier técnica utilizada para construir matrices de proteínas o ácidos nucleicos. En algunas formas de ejecución los anticuerpos de captura se siembran por puntos empleando un "microspotter", que es normalmente una impresora robotizada provista de pasadores, agujas romas o impresión por chorro de tinta. Como sistemas robóticos para imprimir las matrices de anticuerpos aquí descritas son adecuados el robot PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA), con pasadores ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA), así como otras impresoras robotizadas que comercializan BioRobics (Woburn, MA) y Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferiblemente se siembran en la matriz al menos 2, 3, 4, 5 o 6 réplicas de cada anticuerpo de captura.

Otro método para generar las matrices de anticuerpos consiste en dispensar un volumen conocido de una dilución de anticuerpo de captura en cada posición elegida de la matriz, poniendo en contacto un dispensador capilar sobre cada soporte sólido, en condiciones efectivas para dejar un volumen definido de líquido sobre un soporte sólido, y repitiendo este proceso con diluciones de anticuerpos de captura seleccionados en cada posición de la matriz para crear una matriz completa. El método se puede realizar formando varias matrices de este tipo, de modo que la etapa de depositar la solución se aplica a una posición seleccionada sobre cada uno de varios soportes sólidos en cada ciclo repetido. En la patente U.S. n° 5,807,522, p.ej., se puede encontrar una descripción más detallada de dicho método.

En ciertos casos, para generar las matrices de anticuerpos se pueden usar dispositivos de imprimir sobre papel. Por ejemplo, la dilución del anticuerpo de captura deseado se puede cargar en el cabezal de una impresora de chorro de tinta de sobremesa e imprimirla en un soporte sólido adecuado (véase p.ej. Silzel y otros, Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)).

En algunas formas de ejecución la matriz generada sobre el soporte sólido tiene, como mínimo, una densidad de 5 manchas/cm<sup>2</sup> y preferiblemente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000, o 10.000 manchas/cm<sup>2</sup>.

En algunos casos, cada una de las manchas sobre el soporte sólido representa un anticuerpo de captura distinto. En algunos otros casos, varias manchas sobre el soporte sólido representan el mismo anticuerpo de captura, p.ej. una serie de dilución formada por varias concentraciones descendentes del anticuerpo de captura.

En las patentes U.S. n° 6,197,599, 6,777,239, 6,780,582, 6,897,073, 7,179,638 y 7,192,720; en las publicaciones de patente U.S. n° 20060115810, 20060263837, 20060292680 y 20070054326; y en Varnum y otros, Methods Mol. Biol., 264:161-172 (2004) se describen otros ejemplos de métodos de preparación y formación de matrices de anticuerpos sobre soportes sólidos.

Los métodos de barrido de matrices de anticuerpos son conocidos del estado técnico e incluyen, sin limitación, cualquier técnica empleada para escanear matrices de proteínas o ácidos nucleicos. Se pueden adquirir escáners de micromatrices adecuados para emplear en la presente invención a las firmas PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) y Axon Instruments (Union City, CA). Como ejemplo no limitativo, para la detección por fluorescencia se puede emplear un equipo GSI ScanArray3000, combinado con el programa ImaGene para la cuantificación.

#### V. Producción de anticuerpos

Según la presente invención, la generación y la selección de anticuerpos todavía no disponibles comercialmente, para analizar el estado de activación y/o la cantidad total de moléculas transductoras de señales en células de rara circulación, se puede llevar a cabo de varias maneras. Por ejemplo, una vía es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, un antígeno), usando métodos de expresión y purificación conocidos del estado técnico, y otra vía es sintetizar el polipéptido de interés, usando métodos de síntesis peptídica en fase sólida conocidos del estado técnico. Véase p.ej. Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol. 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol. 289 (1997); Kiso y otros, Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99 (1990); Mostafavi y otros, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60, (1995); y Fujiwara y otros, Chem. Pharm. Bull., 44:1326-31 (1996). El polipéptido purificado o sintetizado se puede inyectar, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Un experto en la materia reconocerá que hay muchos procedimientos disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como los descritos en Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Un experto en la materia apreciará asimismo que los fragmentos de fijación o fragmentos Fab mimetizadores de anticuerpos también se pueden preparar a partir de información genética mediante varios procedimientos (véase p.ej. Antibody Engineering: A Practical Approach, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); y Huse y otros, J. Immunol., 149:3914-3920 (1992)).

Además numerosas publicaciones han informado del uso de la tecnología de presentación de fagos para producir y analizar bibliotecas de polipéptidos, con el fin de fijar un antígeno diana escogido (véase p.ej. Cwirla y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382 (1990); Devlin y otros, Science, 249:404-406 (1990); Scott y otros, Science, 249:386-388 (1990); y Ladner y otros, patente U.S. n.º. 5,571,698). Una idea básica de los métodos de presentación de fagos es el establecimiento de una asociación física entre un polipéptido codificado por el ADN fágico y un antígeno diana. Esta asociación física la proporciona la partícula fágica, la cual presenta un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago codificador del polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite el rastreo masivo simultáneo de un gran número de fagos que llevan diferentes polipéptidos. Los fagos que presentan un polipéptido con afinidad por un antígeno diana se fijan al antígeno diana y estos fagos se enriquecen mediante rastreo de afinidad por el antígeno diana. La identidad de los polipéptidos presentados a partir de estos fagos se puede determinar partiendo de sus respectivos genomas. Luego estos métodos permiten sintetizar en masa, por medios convencionales, un polipéptido que haya sido identificado como poseedor de una afinidad de fijación por un antígeno diana deseado (véase p.ej. la patente U.S. n.º 6,057,098).

Después los anticuerpos generados por estos métodos se pueden seleccionar rastreando primero su afinidad y especificidad para el polipéptido antígeno de interés y, si es necesario, comparando los resultados con la afinidad y la especificidad respecto a otros polipéptidos antígenos que se quieren excluir de la fijación. El procedimiento de rastreo puede implicar la inmovilización de los polipéptidos antígenos purificados en pocillos separados de las placas de microvaloración. La solución que contiene un anticuerpo o grupo de anticuerpos potenciales se coloca luego en los respectivos pocillos de microvaloración se incuba durante aproximadamente 30 minutos hasta 2 horas. Después se lavan los pocillos de microvaloración y se añade un anticuerpo secundario marcado (p.ej. un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina, si los anticuerpos cultivados son de ratón) a los pocillos, se incuban durante unos 30 minutos y luego se lavan. Se agrega sustrato a los pocillos y aparecerá una reacción coloreada donde haya anticuerpo del polipéptido antígeno inmovilizado.

Los anticuerpos así identificados pueden analizarse luego para examinar su afinidad y especificidad. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como un patrón con el que se juzga la sensibilidad y la especificidad del inmunoensayo, empleando los anticuerpos que han sido seleccionados. Como la afinidad de fijación de varios anticuerpos puede diferir, p.ej. ciertas combinaciones de anticuerpos pueden interferir estéricamente entre ellos, el rendimiento del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad y especificidad de este anticuerpo.

Los expertos en la materia reconocerán que pueden hacerse muchas propuestas para la producción de anticuerpos o fragmentos de fijación y para el rastreo y selección de la afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos de interés, pero estos enfoques no cambian el ámbito de la presente invención.

#### A. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se cultivan preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido de interés y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el polipéptido de

interés con un soporte proteico que sea inmunogénico en las especies que deben inmunizarse, p.ej. hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o un agente de derivación. Los ejemplos no limitativos de agentes bifuncionales o agentes de derivación incluyen éster de maleimidobenzóil sulfosuccinimida (conjugación mediante restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (conjugación mediante restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$  y  $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , donde R y  $\text{R}_1$  son grupos alquilo distintos.

Los animales se inmunizan contra el polipéptido de interés o contra un conjugado inmunogénico o derivado del mismo, combinando, p.ej., 100  $\mu\text{g}$  (para conejos) o 5  $\mu\text{g}$  (para ratones) del antígeno o conjugado con 3 volúmenes de adyuvante de Freund completo e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Al cabo de un mes los animales se estimulan con aproximadamente 1/5 hasta 1/10 de la cantidad inicial de polipéptido o derivado en adyuvante de Freund incompleto por inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días más tarde se sangran los animales y se analiza el título de anticuerpo. Los animales se estimulan típicamente hasta el nivel del título. Preferiblemente el animal se estimula con el conjugado del mismo polipéptido, pero también se pueden usar conjugados con una proteína inmunogénica diferente y/o mediante un reactivo reticulador distinto. También pueden prepararse conjugados en cultivos de células recombinantes, como proteínas de fusión. En algunos casos pueden usarse agentes de agregación, tales como alumbre, para intensificar la respuesta inmune.

#### 20 B. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen en general de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales de que consta la población son idénticos, excepto en las posibles mutaciones de origen natural que pueda haber en pequeñas cantidades. Por tanto el calificativo "monoclonal" hace referencia a que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos distintos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el método del hibridoma descrito por Kohler y otros, *Nature*, 256:495 (1975) o por cualquier otro método de ADN recombinante conocido del estado técnico (véase p.ej. la patente U.S. n° 4,816,567).

En el método del hibridoma se inmuniza un ratón u otro animal huésped adecuado (p.ej. un hámster) del modo arriba descrito, para obtener como respuesta linfocitos productores de anticuerpos o capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al polipéptido de interés empleado en la inmunización. Como alternativa los linfocitos se inmunizan *in vitro*. Después los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma, usando un agente de fusión idóneo, como por ejemplo polietilenglicol, para formar células de hibridoma (véase p.ej. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, p. 59-103 (1986)). Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio adecuado de cultivo que contiene preferentemente una o más sustancias inhibitoras del crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen del enzima hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), el medio de cultivo para las células de hibridoma incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que impiden el crecimiento de las células carentes de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente y favorecen un elevado nivel de producción estable de anticuerpos por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y/o que son sensibles a un medio tal como el HAT. Como ejemplos de dichas líneas celulares preferidas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos cabe citar, sin limitarse a ellas, líneas de mieloma murino tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 (que suministra el Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), las células SP-2 o X63-Ag8-653 (que suministra la American Type Culture Collection; Rockville, MD) y líneas celulares de mieloma humano o heteromieloma murino-humano (véase p.ej. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); y Brodeur y otros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 51-63 (1987)).

El medio de cultivo en el cual crecen las células de hibridoma se puede ensayar para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de interés. La especificidad de fijación de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina preferiblemente por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de fijación *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de fijación de los anticuerpos monoclonales se puede determinar empleando p.ej. el análisis Scatchard de Munson y otros, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos estándar (véase p.ej. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, p. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo estable para esta finalidad incluyen, por ejemplo D-MEM o RPMI-1640. Además las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, del fluido ascítico o del suero mediante procedimientos comunes de purificación de anticuerpos, como por ejemplo cromatografía de proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel o cromatografía de afinidad.

El ADN codificador de los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar fácilmente por procedimientos convencionales (p.ej. usando sondas oligonucleótidas capaces de fijarse específicamente a genes codificadores de

las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células de simio COS, células ováricas de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra forma no producen anticuerpos, para inducir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Véase p.ej. Skerra y otros, *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); y Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992). El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo las secuencias murinas homólogas por la secuencia codificadora de dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas (véase p.ej. la patente U.S. nº 4,816,567; y Morrison y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o uniendo covalentemente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificadora de un polipéptido no inmunoglobulínico.

En otra forma de ejecución se pueden aislar anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas, empleando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty y otros, *Nature*, 348:552-554 (1990); Clackson y otros, *Nature*, 352:624-628 (1991); y Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). La producción de anticuerpos monoclonales humanos de gran afinidad (rango nM) por intercambio de cadenas está descrita en Marks y otros, *BioTechnology*, 10:779-783 (1992). El uso de la infección combinatoria y la recombinación *in vivo*, como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy amplias, está descrito en Waterhouse y otros, *Nuc. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). Por lo tanto estas técnicas son alternativas viables a los métodos tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales

### C. Anticuerpos humanizados

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos del estado técnico. Preferiblemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido procedentes de una fuente no humana introducidos en él. Estos restos de aminoácido no humanos se denominan frecuentemente residuos "de importación" y suelen tomarse de un dominio variable "de importación". La humanización se puede efectuar, esencialmente, sustituyendo las secuencias de la región hipervariable de un anticuerpo no humano por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véase p.ej. Jones y otros, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature*, 332:323-327 (1988); y Verhoeven y otros, *Science*, 239:1534-1536 (1988). Por consiguiente dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (véase p.ej. la patente U.S. nº 4,816,567), en los cuales se ha sustituido mucho menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos, en los cuales algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de la región marco (FR) están sustituidos por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que deben utilizarse para preparar los anticuerpos humanizados aquí descritos es una consideración importante para reducir la antigenicidad. Conforme al método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se rastrea contra toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominios variables humanos. Entonces la secuencia humana más cercana a la del roedor se acepta como la FR para el anticuerpo humanizado (véase p.ej. Sims y otros, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); y Chothia y otros, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). En otro método se usa una región FR particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo concreto de cadenas ligeras o pesadas. La misma FR se puede utilizar para diversos anticuerpos humanizados diferentes (véase p.ej. Carter y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta y otros, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos se humanicen reteniendo una elevada afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y de diversos productos humanizados conceptuales, utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están generalmente disponibles y son conocidos de los expertos en la materia. Se dispone de programas informáticos que explican y representan las probables estructuras de conformación tridimensional de las secuencias candidatas de inmunoglobulina que han sido escogidas. El examen de estas representaciones permite analizar el probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para fijar su antígeno. De esta forma los restos FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras y de importación, para lograr la característica deseada del anticuerpo, como mayor afinidad por el o los antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable intervienen directa y específicamente en la fijación del antígeno.

Según la presente invención se contemplan varias formas de anticuerpos humanizados. Por ejemplo el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgA, IgG o IgM.

### D. Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización se pueden generar anticuerpos humanos. En algunas formas de ejecución se pueden producir animales transgénicos (p.ej. ratones) capaces de generar un repertorio completo de anticuerpos

humanos tras la inmunización, en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Se ha descrito por ejemplo que la delección homocigótica del gen de la región de unión de cadenas pesadas de los anticuerpos (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal produce la inhibición total de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulinas humanas de la línea germinal a dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos durante la exposición al antígeno. Véase p.ej. Jakobovits y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y otros, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann y otros, Year in Immun., 7:33 (1993); y patentes U.S. nº 5,591,669, 5,589,369 y 5,545,807.

Alternativamente se puede emplear la tecnología de visualización de fagos (véase p.ej. McCafferty y otros, Nature 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, utilizando repertorios genéticos del dominio variable (V) de inmunoglobulinas procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco, en un gen de una proteína principal o secundaria de la cápside de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se visualizan como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula fágica. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fágico, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan también como resultado la selección del gen codificador del anticuerpo que exhibe dichas propiedades. Así, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La visualización del fago se puede realizar en una variedad de formatos, tal como se describe p.ej. en Johnson y otros, Curr. Opin. Struct. Biol., 3:564-571 (1993). Para visualizar los fagos se pueden usar varias fuentes de segmentos genéticos V. Véase p.ej. Clackson y otros, Nature, 352:624-628 (1991). Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y aislar anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos), siguiendo esencialmente las técnicas descritas en Marks y otros, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Griffith y otros, EMBO J., 12:725-734 (1993); y en las patentes U.S. nº 5,565,332 y 5,573,905.

En algunos casos se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro*, tal como está descrito p.ej. en las patentes U.S. nº 5,567,610 y 5,229,275.

#### E. Fragmentos de anticuerpos

Para producir fragmentos de anticuerpo se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente estos fragmentos se derivaban de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase p.ej. Morimoto y otros, J. Biochem. Biophys. Meth., 24:107-117 (1992); y Brennan y otros, Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, ahora estos fragmentos pueden producirse directamente empleando células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos tratadas anteriormente. Como alternativa se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de células *E. coli* y acoplarlos químicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (véase p.ej. Carter y otros, BioTechnology, 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. Otras técnicas de producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para los especialistas. En otras formas de ejecución el anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena simple (scFv). Véase p.ej. la publicación PCT nº WO 93/16185 y las patentes U.S. nº 5,571,894 y 5,587,458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal como el descrito p.ej. en la patente U.S. nº 5,641,870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

#### F. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de fijación para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes del mismo polipéptido de interés. Otros anticuerpos biespecíficos pueden combinar un sitio de fijación para el polipéptido de interés con sitio(s) de fijación para uno o más antígenos. Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p.ej. anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

Los procedimientos de preparación de anticuerpos biespecíficos son conocidos del estado técnico. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, donde las dos cadenas poseen diferentes especificidades (véase p.ej. Millstein y otros, Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la diversidad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una posee la estructura biespecífica correcta. La molécula correcta suele purificarse por cromatografía de afinidad. En la publicación PCT nº WO 93/08829 y en Traunecker y otros, EMBO J., 10:3655-3659 (1991), se revelan procedimientos similares.

Según un enfoque distinto, se fusionan dominios variables de anticuerpo que poseen las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos una parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (CH1) con el sitio necesario para la fijación de cadena ligera esté al menos presente en una de las fusiones. Los ADN codificadores de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de inmunoglobulina se insertan en vectores de expresión separados y son cotransfectados en un organismo huésped.

Esto da una gran flexibilidad para el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en las formas de ejecución, cuando el uso de proporciones desiguales de las tres cadenas polipéptidas en la construcción produce los rendimientos óptimos. No obstante es posible insertar las secuencias codificadoras de dos o de las tres cadenas polipéptidas en un vector de expresión, cuando la expresión de al menos dos cadenas polipéptidas en proporciones iguales produce rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen ninguna importancia especial.

En una forma de ejecución preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de fijación en una rama y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de fijación) en la otra rama. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, porque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una vía fácil de separación. Véase p.ej. la publicación PCT nº WO 94/04690 y Suresh y otros Meth. Enzymol., 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en la patente U.S. nº 5,731,168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo se puede diseñar de forma que el porcentaje de heterodímeros recuperados del cultivo de células recombinantes sea máximo. La interfaz preferida incluye al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son reemplazadas por cadenas laterales más largas (p.ej. de tirosina o triptófano). En la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo se crean "huecos" compensatorios de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) grande(s), reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (p.ej. de alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos comprenden anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado se puede acoplar a avidina y el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados se pueden preparar usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes y las técnicas de reticulación adecuadas son bien conocidas del estado técnico y están reveladas p.ej. en la patente U.S. nº 4,676,980.

En el estado técnico también se conocen técnicas apropiadas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos por enlace químico. En ciertos casos se pueden generar anticuerpos biespecíficos por un procedimiento que consiste en dividir proteolíticamente anticuerpos intactos para producir fragmentos  $F(ab')_2$  (véase p.ej. Brennan y otros, Science, 229:81 (1985)). Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito sódico, a fin de estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos  $F(ab')_2$  generados se transforman luego en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte después en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equivalente del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

En algunas formas de ejecución los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, una molécula  $F(ab')_2$  de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado se puede producir según los métodos descritos en Shalaby y otros, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992). Cada fragmento Fab' fue secretado separadamente de *E. coli* y sometido a un acoplamiento químico directo *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar directamente fragmentos de anticuerpos biespecíficos a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos empleando cremalleras de leucina. Véase p.ej. Kostelny y otros, J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión génica. Los anticuerpos homodímeros se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los anticuerpos heterodímeros. Este procedimiento también se puede utilizar para producir anticuerpos homodímeros. La tecnología "diabody" (de "fragmento bivalente"), descrita por Hollinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para obtener fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente los dominios VH y VL de un fragmento están forzados a aparearse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de fijación de antígenos. En Gruber y otros, J. Immunol., 152:5368 (1994), se describe otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv).

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Así, por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Véase p.ej. Tutt y otros, J. Immunol., 147:60 (1991).

## G. Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos se pueden producir dentro de una célula huésped aislada, en el espacio periplasmático de una célula huésped aislada o pueden ser directamente secretados al medio por una célula huésped. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, primero se elimina el detrito particulado, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y otros, *BioTech.*, 10:163-167 (1992), describen un procedimiento para aislar los anticuerpos secretados en el espacio periplasmático de *E. coli*. Resumiendo, se descongela pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante 30 minutos aproximadamente. El detrito celular se puede eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo es secretado al medio, los sobrenadantes procedentes de estos sistemas de expresión se concentran generalmente mediante un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de dichas etapas se puede incluir un inhibidor de proteasa como el PMSF para impedir la proteólisis y adjuntar antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes inesperados.

La composición del anticuerpo preparado a partir de células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La eficacia de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos basados en cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  humanas (véase p.ej. Lindmark y otros, *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos murinos y para  $\gamma 3$  humano (véase p.ej. EMBO J., 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual está unido el ligando de afinidad es con mayor frecuencia de agarosa, pero también se dispone de otras matrices. Las matrices que tienen estabilidad mecánica, como las de vidrio de poro controlado o de poli(estirenodivinil)benceno, permiten índices de flujo más rápidos y tiempos de proceso más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX<sup>®</sup> (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Para la purificación de proteínas se dispone de otras técnicas, como fraccionamiento en columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE<sup>®</sup>, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de enfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico, en función del anticuerpo que deba recuperarse.

Después de cualquier etapa o etapas preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrófoba a pH bajo, empleando un tampón de elución a un pH comprendido aproximadamente entre 2,5-4,5, realizada preferiblemente a bajas concentraciones salinas (p.ej. 0-0,25 M de sal aproximadamente).

## VI. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la presente invención.

## Ejemplo 1. Separación, estimulación y lisis de células circulantes.

Las células circulantes de un tumor sólido comprenden células que han sido metastatizadas o micrometastatizadas a partir de un tumor sólido, e incluyen células tumorales circulantes (CTCs), células madre cancerosas (CSCs) y/o células que migran hacia el tumor (p.ej. células progenitoras endoteliales circulantes (CEPCs), células endoteliales circulantes (CECs), células mieloides proangiogénicas circulantes, células dendríticas circulantes, etc.). Muestras de paciente que contengan células circulantes se pueden obtener de cualquier fluido biológico accesible (p.ej. sangre, orina, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva, aspirado con aguja fina, etc.). Las células circulantes se pueden aislar de una muestra de un paciente empleando uno o más métodos de separación, como por ejemplo la separación inmunomagnética (véase p.ej. Racila y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth y otros, *Int. J. Cancer*, 92:577-582 (2001)), la separación microfluidica (véase p.ej. Mohamed y otros, *IEEE Trans. Nanobiosci.*, 3:251-256 (2004); Lin y otros, Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (véase p.ej. Mancuso y otros, *Blood*, 97:3658-3661 (2001)), la centrifugación por gradiente de densidad (véase p.ej. Baker y otros, *Clin. Cancer Res.*, 13: 4865-4871 (2003)), y los métodos de depleción (véase p.ej. Meye y otros, *Int. J. Oncol.*, 21:521-530 (2002)).

Aislamiento manual de CTCs:

Separación inmunomagnética de CTCs - aislamiento manual seguido por un ensayo de activación:

- 1) Se emplean perlas magnéticas (DynaM450; Dynal AS; Oslo, Noruega) previamente conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM (Kordia Life Sciences; Leiden, Holanda).
- 2) Justo antes del uso, las perlas Dynabeads prerrevestidas se lavan una vez con un volumen igual de PBS con BSA al 0,01 %.
- 3) Se añaden 25  $\mu$ l de las perlas Dynabeads prerrevestidas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a 2-8°C con suave inclinación y rotación.
- 5) El tubo se coloca en el separador magnético (magneto MPL-1) durante 2 minutos.

- 6) Se descarta el sobrenadante y las células fijadas a las perlas se lavan tres veces por resuspensión en PBS con BSA al 0,01 %, seguida de separación magnética.
- 7) La muestra se resuspende en 100 µl de tampón de estimulación.

5 Preparación de muestras:

- 1) Se extrae sangre periférica de pacientes humanos en un tubo siliconado que contiene 1 mg/ml de EDTA. Se descartan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células epiteliales desprendidas de la vena pinchada.
- 2) Se diluye 1 ml de sangre entera en relación 1:3 con NaCl al 0,9% antes del uso.

10

Preparación de controles:

- 1) Se preparan controles de líneas celulares añadiendo líneas de células cancerosas humanas a células HL-60.
- 2) Los controles de líneas celulares se usan a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  células/ml.

15 Aislamiento manual de CECs y CEPCs:

Como ejemplo no limitativo, se pueden aislar CECs y CEPCs viables con la técnica de separación/enriquecimiento inmunomagnético descrita en Beerepoot y otros, Ann. Oncology, 15:139-145 (2004). Resumiendo, se incubaba sangre periférica con perlas magnéticas (Dynal M450 IgG1) previamente conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD146 (Kordia Life Sciences). Este anticuerpo reconoce todos los linajes de células endoteliales, pero no células hematopoyéticas o epiteliales, en la sangre periférica (George y otros, J. Immunol. Meth., 139:65-75 (1991)). Se puede usar una selección negativa de células hematopoyéticas y epiteliales antes de la selección positiva con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos adecuados (p.ej. perlas Dynal-CD45 para agotar leucocitos, perlas Dynal-CD14 para agotar monocitos, perlas Dynal-EpCAM para agotar células epiteliales (Invitrogen; Carlsbad, CA)). En este ejemplo solo se usa la selección positiva.

20

Separación inmunomagnética de CECs y CEPCs - aislamiento manual seguido por un ensayo de activación:

- 1) Se usan perlas magnéticas (Dynal M450) previamente conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti- CD 146 (Kordia Life Sciences).
- 2) Justo antes del uso, las perlas Dynabeads prerrevestidas se lavan una vez con un volumen igual de PBS con BSA al 0,01 %.
- 3) Se añaden 25 µl de las perlas Dynabeads prerrevestidas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incubaba durante 20 minutos a 2-8°C con suave inclinación y rotación.
- 5) El tubo se coloca en el separador magnético (magneto MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se descarta el sobrenadante y las células fijadas a las perlas se lavan tres veces por resuspensión en PBS con BSA al 0,01 %, seguida de separación magnética.
- 7) La muestra se resuspende en 100 µl de tampón de estimulación.

30

35

Preparación de muestras:

- 1) Se extrae sangre periférica de pacientes humanos en un tubo siliconado que contiene 1 mg/ml de EDTA. Se descartan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células endoteliales desprendidas de la vena pinchada.
- 2) Se diluye 1 ml de sangre entera en relación 1:3 con NaCl al 0,9% antes del uso.

40

Preparación de controles:

- 1) Se preparan controles de líneas celulares añadiendo células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a células HL-60.
- 2) Los controles de líneas celulares se usan a una concentración de  $2,5 \times 10^6$  células/ml.

45

50 Aislamiento manual de CEPCs (sin CECs):

Las CEPCs son un subtipo circulante de células progenitoras derivadas de la médula ósea, con capacidad de diferenciarse en células endoteliales maduras como respuesta a varios factores de crecimiento angiogénicos. Las CEPCs se pueden aislar por selección con anticuerpos que reconocen el marcador superficial CD34. El CD133 es un marcador superficial que diferencia las células progenitoras endoteliales inmaduras (EPCs) o las células madre hematopoyéticas primitivas HSCs) de las CEPCs. Se han descrito varios procedimientos de aislamiento de CEPCs de distintas fuentes, en los cuales se emplea el cultivo adherente o microperlas magnéticas. En este ejemplo se usa un protocolo modificado respecto al descrito en Asahara y otros, Science, 275:964-967 (1997).

55

Separación inmunomagnética de CEPCs - aislamiento manual seguido por un ensayo de activación:

- 1) Se usan perlas magnéticas (Dynal M450 CD34). Estas perlas están revestidas con un anticuerpo monoclonal específico del antígeno superficial CD34.
- 2) Justo antes del uso, las perlas Dynabeads prerrevestidas se lavan una vez con un volumen igual de PBS con BSA al 0,01 %.
- 3) Se añaden 25 µl de las perlas Dynabeads prerrevestidas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incubaba durante 20 minutos a 2-8°C con suave inclinación y rotación.

60

65

- 5) El tubo se coloca en el separador magnético (magneto MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se descarta el sobrenadante y las células fijadas a las perlas se lavan tres veces por resuspensión en PBS con BSA al 0,01 %, seguida de separación magnética.
- 7) La muestra se resuspende en 100 µl de tampón de estimulación.

Preparación de muestras:

- 1) Se extrae sangre periférica de pacientes humanos en un tubo siliconado que contiene 1 mg/ml de EDTA. Se descartan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células endoteliales desprendidas de la vena pinchada.
- 2) Se diluyen 10 ml de sangre en relación 1:1 con una solución salina equilibrada.
- 3) Se extienden 4 ml de sangre diluida sobre 3 ml de Ficoll-Paque en tubos de 10 ml.
- 4) Los tubos se centrifugan a 400 x g durante 30-40 min a 18-20°C.
- 5) La capa superior que contiene plasma y plaquetas se extrae con una pipeta Pasteur estéril, sin tocar la capa de células mononucleares en la interfase.
- 6) Las células mononucleares se transfieren a un tubo estéril de centrifuga con una pipeta estéril.
- 7) Se añaden 6 ml de solución salina equilibrada y las células se resuspenden suavemente.
- 8) La mezcla se centrifuga a 60-100 x g durante 10 min a 18-20°C.
- 9) Se elimina el sobrenadante y las células mononucleares de cada tubo se resuspenden en 1 ml de PBS.

Aislamiento de CTCs, CECs y CEPCs usando el sistema Veridex:

Veridex (Warren, NJ) ha comercializado el sistema CellSearch, que consta de un sistema CellPrep, el kit CellSearch Epithelial Cell y el analizador CellSpotter. El sistema CellSearch es un sistema semiautomatizado de preparación de muestras (Kagan y otros, J. Clin. Ligand Assay, 25:104-110(2002)). El kit CellSearch Epithelial Cell consta de: ferrofluidos recubiertos con anticuerpos anti-EpCAM específicos de células epiteliales; anticuerpos de citoqueratinas 8, 18 y 19 conjugados con ficoeritrina; un anticuerpo anti-CD45 conjugado con alofocianina; colorante DAPI y tampones para lavar, permeabilizar y resuspender las células. El protocolo utilizado en este ejemplo también está descrito en Allard y otros, Clin. Cancer Res., 10:6897-6904 (2004). El sistema Veridex completo se puede usar para el recuento de CTC o puede servir de método de aislamiento previo al análisis de activación de la vía, retirando la muestra manualmente tras la separación con el sistema CellPrep. El número de CTCs puede servir de información para el desarrollo del algoritmo.

Sistema Veridex – enriquecimiento de CTC seguido de recuento:

- 1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de tampón, se centrifugan a 800 x g durante 10 minutos y se colocan en el sistema CellPrep.
- 2) Tras la aspiración del sobrenadante por el aparato, éste añade los ferrofluidos.
- 3) El aparato realiza la incubación y la subsiguiente etapa de separación magnética.
- 4) Las células no fijadas y el plasma restante son aspirados.
- 5) Se agregan los reactivos de tinción junto con el tampón de permeabilización para la coloración fluorescente.
- 6) Tras la incubación por el sistema, las células se separan de nuevo magnéticamente y se resuspenden en el dispositivo MagNest Cell Presentation para su análisis con el analizador CellSpotter.
- 7) Se coloca el dispositivo en el analizador CellSpotter, un microscopio de fluorescencia semiautomatizado de cuatro colores.
- 8) Las imágenes que cumplen los criterios definidos por Veridex se capturan y se muestran mediante un navegador de internet para la selección manual definitiva.
- 9) Los resultados del recuento de células se expresan como número de células por 7,5 ml de sangre.

Sistema Veridex – enriquecimiento de CTC seguido de un ensayo de activación:

- 1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de tampón, se centrifugan a 800 x g durante 10 minutos y se colocan en el sistema CellPrep.
- 2) Tras la aspiración del sobrenadante por el aparato, éste añade los ferrofluidos.
- 3) El aparato realiza la incubación y la subsiguiente etapa de separación magnética.
- 4) Las células no fijadas y el plasma restante son aspirados.
- 5) Se resuspende la muestra en 100 µl de tampón de estimulación.

Sistema Veridex – enriquecimiento de CEC y CEPC seguido de un ensayo de activación:

- 1) Veridex ofrece un kit CellTracks de células endoteliales que utiliza la captura de CECs y CEPCs con un anticuerpo anti-CD146. El kit CellTracks de células endoteliales se usa junto con el sistema CellTracks AutoPrep de Veridex para la preparación de la muestra de sangre y el analizador CellTracks II para contar e identificar las CECs y CEPCs de la sangre entera. El protocolo es el mismo que para el kit CellSearch de células epiteliales.

Preparación de muestras:

- 1) Se introduce sangre periférica de pacientes humanos en el tubo CellSave Preservative según las instrucciones del fabricante. Se descartan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células epiteliales o endoteliales desprendidas de la vena pinchada.

Aislamiento manual de CSCs:

Se está demostrando que los tumores incluyen una pequeña población de células madre supuestamente cancerosas con mecanismos singulares de autorrenovación y supervivencia (véase p.ej. Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51:1-28 (2004); Reya y otros, Nature, 414:105-111 (2001); Dontu y otros, Trends Endocrinol. Metal., 15:193-197 (2004); y Dick, Nature, 423:231-233 (2003)). Las células madre cancerosas (CSCs) pueden estar inactivas durante mucho tiempo, haciéndose resistentes a los fármacos quimioterapéuticos que tiene como diana las células en división. Esta población iniciadora de cáncer se puede identificar por la activación de vías de autorrenovación y supervivencia cuando se realiza una terapia de eliminación selectiva. Se han descrito procedimientos de aislamiento de CSCs con el uso de un cultivo adherente o de microperlas magnéticas. En este ejemplo se emplea un protocolo modificado respecto al descrito en Cote y otros, Clin. Can. Res., 12:5615 (2006).

Separación inmunomagnética de CSC – aislamiento manual seguido de un ensayo de activación:

- 1) Se emplean perlas magnéticas (Dynal AS; Oslo, Noruega). Estas perlas se recubren con un anticuerpo monoclonal específico del antígeno superficial CD34 o CD133.
- 2) Justo antes de usarlas, las perlas Dynabeads prerrevestidas se lavan una vez con un volumen igual de PBS con BSA al 0,01 %.
- 3) Se añaden  $1-10^7$  Dynabeads prerrevestidas a 3 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 60 minutos a 2-8°C con suave inclinación y rotación.
- 5) Se divide la mezcla en porciones de 1 ml y cada tubo se coloca en el separador magnético (magneto MPL-1) durante al menos 6 minutos.
- 6) Se descarta el sobrenadante y las células fijadas a las perlas se lavan tres veces por resuspensión en PBS con BSA al 0,01 %, seguida de separación magnética.
- 7) Se resuspende la muestra en 100  $\mu$ l de tampón de estimulación.

Preparación de muestras:

- 1) Se obtienen muestras de médula ósea de pacientes de cáncer inicial de mama, con el consentimiento del paciente informado.
- 2) La médula ósea aspirada se procesa de la forma descrita en Bauer y otros, Clin. Can. Res., 6:3552-3559 (2000)). La fracción celular mononuclear que contiene cualquier tipo de células tumorales diseminadas se enriquece mediante centrifugación por gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, usando una centrífuga Beckman GS-6 a 4000 x g durante 35 minutos, y se lava dos veces con PBS.

Estimulación celular y lisis de CTCs aisladas:

Estimulación celular:

- 1) Se añaden a las células los factores de crecimiento TGF- $\alpha$  (100 nM), heregulina (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

- 1) La muestra se trata durante 30 minutos a 37°C con Herceptin, Lapatanib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas.
- 2) Luego se estimulan las células añadiendo los factores de crecimiento TGF- $\alpha$  (100 nM), heregulina (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (realimentación):

- 1) La muestra se trata durante 30 minutos a 37°C con Herceptin, Lapatanib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas.
- 2) Luego se estimulan las células con los factores de crecimiento TGF- $\alpha$  (100 nM), heregulina (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuba a 37°C durante 120 minutos.

Las CTCs estimuladas se lisan empleando el siguiente protocolo:

- 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos que figuran en la tabla 1.
- 2) Tras el lavado final las células se resuspenden en 100  $\mu$ l de tampón enfriado sobre hielo.
- 3) La incubación se efectúa sobre hielo durante 30 minutos.
- 4) La mezcla se centrifuga durante 10 minutos en una centrífuga Microfuge a velocidad máxima, para separar las perlas del lisado.
- 5) El lisado se transfiere a un nuevo tubo de ensayo para análisis o almacenamiento a -80°C.

Tabla 1

Receta de tampón de lisis (10 ml)			
Reactivos	Conc. de reserva	Conc. final	Volumen
Triton X-100 al 10%	10	1	1,00
Tris 1 M, pH 7,5	1	0,05	0,05
NaF 1 M	1	0,05	0,05
NaCl 5 M	5	0,1	0,20
B-glicerolfosfato 2 M	1	0,05	0,50
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,1M	0,1	0,001	0,10
1 mg/ml de pepstatina	1	0,10	
Mini proteasa completo			1 tableta
EDTA 0,5 M	0,5	0,005	0,10
		Total (ml)	3,00
		Agua (ml)	7,00

Estimulación celular y lisis de CECs y/o CEPCs aisladas:

- 5 Se cree que el VEGF favorece la supervivencia activando vías antiapoptóticas tanto en las CEPCs (Larrivee y otros, J. Biol. Chem., 278:22006-22013 (2003)) como en las CECs maduras que han sido descamadas de la pared del recipiente (Solovey y otros, Blood, 93:3824-3830 (1999)). El VEGF también puede estimular la proliferación de CEPCs o de CECs maduras, aunque parece que las CECs maduras tienen una capacidad de proliferación limitada en comparación con las CEPCs (Lin y otros, J. Clin. Invest., 105:71-77 (2000)). Por estas razones las CECs y/o las CEPCs se activan por incubación con VEGF antes de la lisis.

## Estimulación celular:

- 1) Se añaden a las células los factores de crecimiento VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o angiopoyetina, cada uno de ellos a 100 nM, y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

## Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

- 1) La muestra se trata durante 30 minutos a 37°C con Avastin, Nexavar, Sutent y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas.  
2) Luego se estimulan las células añadiendo los factores de crecimiento VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o angiopoyetina, cada uno de ellos a 100 nM, y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

## Estimulación celular con tratamiento farmacológico (realimentación):

- 1) La muestra se trata durante 30 minutos a 37°C con Avastin, Nexavar, Sutent y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas.  
2) Luego se estimulan las células añadiendo VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o angiopoyetina, cada uno de ellos a 100 nM, y se incuba a 37°C durante 120 minutos.

## Las células CECs y/o CEPCs aisladas se lisan empleando el siguiente protocolo:

- 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos que figuran en la tabla 1.  
2) Tras el lavado final las células se resuspenden en 100 µl de tampón enfriado sobre hielo.  
3) La incubación se efectúa sobre hielo durante 30 minutos.  
4) La mezcla se centrifuga durante 10 minutos en una centrífuga Microfuge a velocidad máxima, para separar las perlas del lisado.  
5) El lisado se transfiere a un nuevo tubo de ensayo para análisis o almacenamiento a -80°C.

Estimulación celular y lisis de CSCs aisladas:

## Células estimuladas:

- 1) Se añaden a las células los factores de crecimiento TGF-α (100 nM), heregulina (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

## Células estimuladas, con tratamiento farmacológico:

- 1) La muestra se trata durante 30 minutos a 37°C con Herceptin, Lapatanib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas.  
2) Luego se estimulan las células añadiendo los factores de crecimiento TGF-α (100 nM), heregulina (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

## Células estimuladas, con tratamiento farmacológico (realimentación):

- 1) La muestra se trata durante 30 minutos a 37°C con Herceptin, Lapatanib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas.

2) Luego se estimulan las células añadiendo los factores de crecimiento TGF- $\alpha$  (100 nM), heregulina (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células CSC aisladas se lisan empleando el siguiente protocolo:

- 5 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos que figuran en la tabla 1.
- 2) Tras el lavado final las células se resuspenden en 100  $\mu$ l de tampón enfriado sobre hielo.
- 3) La incubación se efectúa sobre hielo durante 30 minutos.
- 4) La mezcla se centrifuga durante 10 minutos en una centrífuga Microfuge a velocidad máxima, para separar las perlas del lisado.
- 10 5) El lisado se transfiere a un nuevo tubo de ensayo para análisis o almacenamiento a -80°C.

Ejemplo 2. Detección de células individuales mediante ELISA Sándwich con amplificación de la señal de tiramida como detector individual.

15 Este ejemplo explica un detector individual ELISA Sandwich multiplex de gran rendimiento, con rango dinámico superior, que es adecuado para analizar los estados de activación de las moléculas transductoras de señales en células de rara circulación:

- 20 1) Una placa de microvaloración de 96 pocillos se recubrió por la noche a 4°C con anticuerpo de captura.
- 2) Al día siguiente la placa se bloqueó con BSA al 2%/TBS-Tween durante 1 hora.
- 3) Después de lavar con TBS-Tween se añadió el lisado celular o proteína recombinante en dilución seriada y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 4) La placa se lavó 4 veces con TBS-Tween y luego se incubó con un anticuerpo detector marcado con biotina durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 25 5) Tras la incubación con el anticuerpo detector, la placa se lavó cuatro veces con TBS-Tween y luego se incubó con peroxidasa de rábano picante marcada con estreptavidina (SA-HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente, para permitir la fijación de la SA-HRP al anticuerpo detector marcado con biotina.
- 6) Para amplificar la señal se agregaron 5 mg/ml de biotina-tiramida con 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se dejó reaccionar durante 15 minutos.
- 30 7) Después de lavar seis veces con TBS-Tween se añadió SA-HRP y se incubó durante 30 minutos.
- 8) Después de lavar el sustrato HRP 6 veces con TBS-Tween se añadió TMB y el color se desarrolló durante 2-10 minutos en la oscuridad. La reacción se detuvo agregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M. La señal se leyó a 450/570 nm en un lector de microplacas.

35 La figura 3 muestra la detección del RFCE total en células A431, empleando un ELISA que comprende anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpos de captura y detección. La sensibilidad del inmunoensayo fue aproximadamente de 0,25 pg/pocillo, basada en un dominio extracelular recombinante de RFCE humano. La concentración de RFCE calculada fue aproximadamente de 0,6 pg en cada célula A431.

40 La figura 4 muestra la detección de RFCE fosforilado en células A431, empleando un ELISA que comprende un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de RFCE como el anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal marcado con biotina contra el RFCE fosforilado como el anticuerpo detector. Una dilución doble en serie del anticuerpo de captura reveló un incremento de la señal de 1,78 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,0625  $\mu$ g/ml.

45 La figura 5 muestra la detección de ErbB2 total en células SKBr3, empleando un ELISA que comprende anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de ErbB2 como anticuerpo de captura y anticuerpo detector. El rango de detección aproximado del inmunoensayo estaba comprendido entre 1.000 y 1,37 células. Hubo un incremento de la señal de 2,71 veces respecto al fondo (relación señal/ruido), al nivel celular 1,37, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 1  $\mu$ g/ml.

50 La figura 6 muestra la detección de ErbB2 fosforilado en células SKBr3, empleando un ELISA que comprende un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de ErbB2 como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra ErbB2 fosforilado como anticuerpo detector. El rango de detección aproximado del inmunoensayo estaba comprendido entre 500 y 5 células. Hubo un incremento de la señal de 3,03 veces respecto al fondo (relación señal/ruido), al nivel celular 5, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 1  $\mu$ g/ml.

55 La figura 7 muestra la detección del total de proteína Erk2 fosforilada en células SKBr3, empleando un ELISA que comprende anticuerpos monoclonales contra Erk2 como anticuerpo de captura y anticuerpo detector. Hubo un incremento de la señal de 3,25 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) para la Erk2 total al nivel celular 1,37. Igualmente hubo un incremento de la señal de 3,17 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) para la Erk2 fosforilada, al nivel celular 1,37.

60 Ejemplo 3. Detección de células individuales mediante una micromatriz ELISA con amplificación de la señal de tiramida como detector individual.

65

Este ejemplo explica un detector individual de micromatriz ELISA Sandwich multiplex de gran rendimiento, con rango dinámico superior, que es adecuado para analizar los estados de activación de las moléculas transductoras de señales en células de rara circulación:

- 5 1) Se imprimió anticuerpo de captura en una placa FAST de 16 bloques (Whatman Inc.; Florham Park, NJ) con una dilución doble seriada.
- 2) Después de secarla por la noche, la placa se bloqueó con tampón de bloqueo Whatman.
- 3) Se añadieron 80 µl de lisado celular sobre cada bloque, diluido 10 veces en serie. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.
- 10 4) Después de seis lavados con TBS-Tween se incubaron 80 µl de anticuerpo detector marcado con biotina durante dos horas a temperatura ambiente.
- 5) Después de seis lavados se añadió peroxidasa de rábano picante marcado con estreptavidina (SA-HRP) y se incubó durante 1 hora, para permitir la fijación de la SA-HRP al anticuerpo detector marcado con biotina.
- 15 6) Para la amplificación de la señal se agregaron 80 µl de biotina-tiramida a 5 mg/ml y se dejó reaccionar durante 15 minutos. La placa se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.
- 7) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubó durante 30 minutos. Luego la placa se lavó dos veces, se secó durante 5 minutos y se barrió en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

20 La figura 8 muestra la detección del total de RFCE en células A431, usando una micromatriz ELISA que comprende anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpo de captura y anticuerpo detector. Un ensayo según una curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células demostró que el formato de micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar RFCE en aproximadamente 1 - 10.000 células, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. Un ensayo según una curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura demostró que podía detectarse RFCE a partir de una célula. Hubo un incremento de la señal de 2,11 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,0625 mg/ml.

30 La figura 9 muestra la detección de RFCE fosforilado en células A431, empleando una micromatriz ELISA que comprende un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de RFCE como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra RFCE fosforilado como anticuerpo detector. Un ensayo según una curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células demostró que el formato de micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar RFCE fosforilado en 1 - 10.000 células aproximadamente, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. Un ensayo según una curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura demostró que se podía detectar RFCE a partir de una célula. Hubo un incremento de la señal de 1,33 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,125 mg/ml.

40 La figura 10 muestra la detección de ErBb2 total en células SKBr3, usando una micromatriz ELISA que comprende anticuerpos monoclonales contra el dominio extracelular de ErBb2 como el anticuerpo de captura y anticuerpo detector. Un ensayo según una curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células demostró que el formato de micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar ErBb2 en 1 - 10.000 células aproximadamente, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. Un ensayo según una curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura demostró que podía detectarse ErBb2 a partir de una célula. Hubo un incremento de la señal de 15,27 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,125 mg/ml.

50 La figura 11 muestra la detección de ErBb2 fosforilado en células SKBr3, empleando una micromatriz ELISA que comprende un anticuerpo monoclonal contra el dominio extracelular de ErBb2 como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal contra ErBb2 fosforilado como anticuerpo detector. Un ensayo según una curva de dilución del anticuerpo de captura basada en el número de células demostró que el formato de micromatriz ELISA tenía un amplio rango dinámico para detectar ErBb2 en 1 - 10.000 células aproximadamente, con diferentes concentraciones de anticuerpo de captura en las series de dilución. Un ensayo según una curva de valoración celular basada en las series de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura demostró que podía detectarse ErBb2 a partir de una célula. Hubo un incremento de la señal de 5,45 veces respecto al fondo (relación señal/ruido) al nivel celular uno, cuando la concentración de anticuerpo de captura era de 0,125 mg/ml.

60 Ejemplo 4. Detección de células individuales mediante una micromatriz ELISA con amplificación de la señal de tiramida como detector dual de proximidad.

Este ejemplo explica un detector dual de proximidad multiplex mediante una micromatriz ELISA Sandwich de gran rendimiento, con rango dinámico superior, que es adecuado para analizar los estados de activación de las moléculas transductoras de señales en células de rara circulación:

65

1) Se imprimió anticuerpo de captura en una placa FAST de 16 bloques (Whatman Inc.; Florham Park, NJ) con una serie de dilución de 1 mg/ml hasta 0,004 mg/ml.

2) Después de secarla por la noche, la placa se bloqueó con tampón de bloqueo Whatman.

5 3) Se añadieron 80 µl de lisado de células A431 sobre cada bloque, diluido 10 veces en serie. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

4) Después de seis lavados con TBS-Tween se añadieron a las placas 80 µl de anticuerpos detectores para el ensayo de proximidad, diluidos en TBS-Tween/BSA al 2%/FBS al 1%. Como anticuerpos detectores se usaron: (1) un anticuerpo monoclonal anti-RFCE, conjugado directamente con glucosa oxidasa (GO), y (2) un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado directamente con peroxidasa de rábano picante (HRP). La incubación tuvo lugar durante 2 horas a temperatura ambiente.

10 5) Como alternativa, en la etapa de detección se empleó un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado con biotina. En estos casos, después de seis lavados se incluyó una etapa adicional subsiguiente de incubación con estreptavidina-HRP durante 1 hora.

15 6) Como alternativa, en la etapa de detección se empleó un conjugado del anticuerpo anti-RFCE con glucosa oxidasa (GO) a través de un oligonucleótido. Se utilizó el conjugado directo de HRP con el anticuerpo de RFCE fosforilado o mediante biotina-estreptavidina (SA).

7) Para la amplificación de la señal se agregaron 80 µl de biotina-tiramida a 5 mg/ml y se dejó reaccionar durante 15 minutos. La placa se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.

20 8) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubó durante 30 minutos. Luego la placa se lavó dos veces, se secó durante 5 minutos y se barrió en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

La figura 12 muestra una comparación entre la micromatriz ELISA de detección dual de proximidad y la micromatriz ELISA de detección individual. La tabla 2 muestra la sensibilidad de la micromatriz ELISA de detección dual de proximidad frente a la micromatriz ELISA de detección individual. Se indica para cada concentración de células A431 la señal respecto al fondo (relación señal/ruido) de los formatos de detección de proximidad e individual. Como se indica en la tabla 2 la micromatriz ELISA de detección dual de proximidad aumentó 3 veces aproximadamente la sensibilidad al nivel celular uno.

30 Tabla 2

Nº de células	Señal	Señal específica	Formato de proximidad (relación S/R)	Formato de detección individual (relación S/R)
100	547	465	6,6	2,1
10	388	306	4,7	1,3
1	295	231	3,6	1,3
0	82			

La figura 13 muestra la especificidad del ensayo de micromatriz ELISA de detección individual frente a la micromatriz ELISA de detección dual de proximidad. Los ensayos que generaron curvas de valoración de RFCE fosforilado a varias concentraciones de anticuerpos de captura en el formato de detección individual mostraron un fondo muy alto, debido a la falta de especificidad del anticuerpo de detección individual. En cambio los ensayos que generaron curvas de valoración de RFCE fosforilado a varias concentraciones de anticuerpos de captura en el formato de detección dual de proximidad mostraron un fondo muy bajo, debido a la mayor especificidad obtenida al detectar la proximidad entre dos anticuerpos detectores.

Ejemplo 5. Detección de células individuales en los estados de activación de varios transductores de señales mediante micromatrices de detección dual de proximidad direccionables.

Este ejemplo explica un ensayo multiplex de gran rendimiento con una micromatriz direccionable de detección dual de proximidad, que tiene un rango dinámico superior adecuado para analizar los estados de activación de varias moléculas transductoras de señales en células de rara circulación:

1) Se imprimieron anticuerpos de captura en una placa FAST de 16 bloques (Whatman Inc.). Los anticuerpos de captura impresos fueron RFCE, HER2, Erk, Shc, PI3K y pan-citoqueratina. Se usó una serie de dilución doble de cada anticuerpo de captura (0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml y 0,0625 mg/ml) y de cada dilución del anticuerpo se hicieron siembras dobles y cuádruples.

2) Después de secarla por la noche, la placa se bloqueó con tampón de bloqueo Whatman.

3) Se añadieron 80 µl de lisado celular sobre cada bloque, diluido 10 veces en serie. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

4) Después de seis lavados con TBS-Tween se añadieron a las placas 80 µl de anticuerpos detectores para el ensayo de proximidad, diluidos en TBS-Tween/BSA al 2%/FBS al 1%. Como anticuerpos detectores se usaron: (1) un anticuerpo monoclonal anti-RFCE, conjugado directamente con glucosa oxidasa (GO), y (2) un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado directamente con HRP. La incubación tuvo lugar durante 2 horas a temperatura ambiente.

5) Como alternativa, en la etapa de detección se empleó un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado con biotina. En estos casos, después de seis lavados se incluyó una etapa adicional subsiguiente de incubación con estreptavidina-HRP durante 1 hora.

6) Como alternativa, en la etapa de detección se empleó un conjugado del anticuerpo anti-RFCE con glucosa oxidasa a través de un oligonucleótido. Se empleó el conjugado directo de HRP con el anticuerpo de RFCE fosforilado o mediante biotina-estreptavidina (SA).

7) Para detectar el HER2 total y la proteína fosforilada, las etapas 4), 5) o 6) se llevaron a cabo empleando un anticuerpo monoclonal detector del HER2 en vez del anticuerpo monoclonal detector del RFCE.

8) Para la amplificación de la señal se agregaron 80 µl de biotina-tiramida a 5 mg/ml y se dejó reaccionar durante 15 minutos. La placa se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.

9) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubó durante 30 minutos. Luego la placa se lavó dos veces, se secó durante 5 minutos y se barrió en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

La figura 14 muestra un ejemplo de forma de ejecución del formato de la micromatriz direccionable. Cinco dianas son asequibles mediante anticuerpos de captura específicos (p.ej. RFCE, HER2, Shc, Erk y PI3K). Los complejos fosforilados de Shc, Erk o PI3K con RFCE o HER2 se pueden detectar sobre esta matriz empleando el formato de detección dual de proximidad. La pan-citoqueratina (PanCK) sirve de control para normalizar al número de células epiteliales.

La figura 15 muestra la detección de los niveles de Shc fosforilado en un análisis de valoración de células A431 estimuladas. La matriz direccionable facilita simultáneamente información sobre la fosforilación de RFCE y HER2.

Ejemplo 6. Extensión del rango dinámico de las micromatrices de detección dual de proximidad.

Este ejemplo explica que el rango dinámico para el análisis de los estados de activación de moléculas transductoras de señales en células de rara circulación se puede aumentar realizando una serie de dilución del anticuerpo de captura en un ensayo multiplex de gran rendimiento, con una micromatriz de detección dual de proximidad:

1) Se imprimieron anticuerpos de captura en una placa FAST de 16 bloques (Whatman Inc.). Cada anticuerpo de captura se diluyó en serie 2 veces para un total de nueve concentraciones (1 mg/ml inicial; 0,004 mg/ml final).

2) Después de secarla por la noche, la placa se bloqueó con tampón de bloqueo Whatman.

3) Se añadieron 80 µl de lisado celular sobre cada bloque, diluido 10 veces en serie. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

4) Después de seis lavados con TBS-Tween se añadieron a las placas 80 µl de anticuerpos detectores para el ensayo de proximidad, diluidos en TBS-Tween/BSA al 2%/FBS al 1%. Como anticuerpos detectores se usaron: (1) un anticuerpo monoclonal anti-RFCE, conjugado directamente con glucosa oxidasa (GO), y (2) un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado directamente con HRP. La incubación tuvo lugar durante 2 horas a temperatura ambiente.

5) Como alternativa, en la etapa de detección se empleó un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado con biotina. En estos casos, después de seis lavados se incluyó una etapa adicional subsiguiente de incubación con estreptavidina-HRP durante 1 hora.

6) Como alternativa, en la etapa de detección se empleó un conjugado del anticuerpo anti-RFCE con glucosa oxidasa a través de un oligonucleótido. Se empleó el conjugado directo de HRP con el anticuerpo de RFCE fosforilado o mediante biotina-estreptavidina (SA).

7) Para la amplificación de la señal se agregaron 80 µl de biotina-tiramida a 5 mg/ml y se dejó reaccionar durante 15 minutos. La placa se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.

8) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubó durante 30 minutos. Luego la placa se lavó dos veces, se secó durante 5 minutos y se barrió en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

La figura 16 muestra las curvas de dilución de un anticuerpo de captura anti-RFCE. Mediante el empleo de matrices direccionables, el RFCE fosforilado y total se detectó al nivel celular simple para células A431 estimuladas. El rango dinámico de este ensayo fue superior a 5 logs. Cada curva individual tuvo un rango dinámico aproximado de 2 logs, pero el rango dinámico se incrementó de manera significativa combinando los datos de las 6 curvas informativas.

Ejemplo 7 Conjugación de oligonucleótidos con anticuerpos.

Este ejemplo explica un procedimiento de conjugación y control de calidad para generar anticuerpos o enzimas conjugados con oligonucleótidos.

Conjugación:

1) Se sintetizaron oligonucleótidos conectores 72-meros con un grupo 5'-SH y un espaciador de 6-carbonos.

2) Los oligonucleótidos conectores liofilizados se disolvieron en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4. Luego se trataron 125 nmoles de conectores con TCEP-HCl 0,5 M (Pierce; Rockford, IL), a una concentración final de 50 mM, a la

temperatura ambiente durante 2 horas. El Tris, la TCEP y los conectores no conjugados se eliminaron por centrifugación en una columna desaladora.

3) Los oligonucleótidos conectores desprotegidos resultantes se conjugaron con las aminas primarias de proteínas diana (p.ej. anticuerpos o enzimas) empleando un reticulador heterobifuncional tal como SMCC en un volumen de reacción de 100 ml.

4) La mezcla reactiva se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Los anticuerpos o enzimas conjugados con oligonucleótidos se purificaron por filtración en gel con una columna Sephacryl S-200 HR (GE Healthcare; Piscataway, NJ).

Calificación de los conjugados:

1) Después de conjugar las moléculas de glucosa oxidasa (GO) con un primer oligonucleótido conector se recogieron tras la purificación tres fracciones de los GO-oligonucleótidos resultantes y se imprimieron sobre placas recubiertas de nitrocelulosa diluidas 10 veces en serie.

2) Se conjugó IgG con Alexa 647 y con un segundo oligonucleótido conector que presentaba una secuencia complementaria del primer oligonucleótido conector. Los anticuerpos resultantes conjugados con Alexa 647-oligonucleótido se aplicaron sobre el chip y se hibridaron en tampón 1X PBS durante 1 h a temperatura ambiente y se lavaron varias veces.

3) Las placas se secaron y se examinaron con un escáner de micromatriz para confirmar la hibridación específica de la secuencia nucleótida.

4) Un ensayo enzimático con glucosa oxidasa confirmó que el proceso de conjugación no alteró la función del enzima.

La figura 17 demuestra que los anticuerpos conjugados con Alexa 647-oligonucleótido tenían la mayor afinidad de fijación por los GO-oligonucleótidos en las fracciones 13-15.

Ejemplo 8. Anticuerpos conjugados con oligonucleótidos para la detección simultánea del RFCE total y fosforilado.

Este ejemplo explica un ensayo multiplex de gran rendimiento con una micromatriz, para analizar los estados de activación de moléculas transductoras de señales en células de rara circulación, empleando los oligonucleótidos conjugados descritos en el ejemplo 7:

1) Se imprimió anticuerpo de captura en una placa FAST de 16 bloques (Whatman Inc.).

2) Después de secarla por la noche, la placa se bloqueó con tampón de bloqueo Whatman.

3) Se añadieron 80 µl de lisado celular sobre cada bloque, diluido 10 veces en serie. La placa se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.

4) Después de seis lavados con TBS-Tween se añadieron a las placas 80 µl de anticuerpos detectores para el ensayo de proximidad, diluidos en TBS-Tween/BSA al 2%/FBS al 1%. Como anticuerpos detectores se usaron: (1) un anticuerpo monoclonal anti-RFCE, conjugado directamente con Alexa 647 y un oligonucleótido conector que comprende una secuencia complementaria de un oligonucleótido conector conjugado con glucosa oxidasa (GO), y (2) un anticuerpo monoclonal detector de RFCE fosforilado, conjugado directamente con peroxidasa de rábano picante (HRP). El conjugado de Alexa 647-oligonucleótido anti-RFCE se puso en contacto con el GO-oligonucleótido para formar el complejo representado en la figura 18. El exceso de reactivos no fijados se eliminó lavando seis veces con TBS-Tween.

5) Luego se añadió glucosa a la reacción, junto con tiramida-Alexa 555.

6) Los niveles totales de RFCE se detectaron por fijación directa del anticuerpo anti-RFCE conjugado con Alexa 647-oligonucleótido. El RFCE fosforilado se detectó mediante la fijación de proximidad del GO-oligonucleótido al anticuerpo anti-RFCE conjugado con HRP y se visualizó por amplificación de la señal de tiramida.

7) La placa se analizó con un láser específico para Alexa 647 y Alexa 555 en un escáner de micromatriz (Perkin-Elmer, Inc.).

La figura 19 muestra la detección simultánea de RFCE total y RFCE fosforilado. El RFCE total (t-RFCE) se detectó mediante un ensayo de fijación directa a partir de tan solo 10 células y el RFCE fosforilado (p-RFCE) se detectó a partir de una célula. Con el método de amplificación de la señal de proximidad se detectaron  $10e^5$  de moléculas de p-RFCE. El límite de detección de p-RFCE se incrementó más de 100 veces con el uso del formato de ensayo de proximidad.

Ejemplo 9. Detección de la señalización de células tumorales circulantes (CTC) en pacientes de cáncer de mama.

La fabricación y el procesamiento de micromatrices están adaptados a partir de métodos descritos por Chan y otros, Nat. Med., 10:1390-1396 (2004). Se transfieren a una placa de polipropileno de 384 pocillos (de 50 µl/pocillo) anticuerpos (1 mg/ml) contra los transductores de señales RFCE, ErbB2, ErbB3, ErbB4, IGF-1R, Akt, Erk, p70S6K, Bad, Rsk, Mek, cSrc, citoqueratina, tubulina, β-actina y anticuerpo anti-ratón (control positivo) (matriz 4/4), usando una micromatriz robótica de impresión de contacto (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) provista de agujas sólidas para sembrar anticuerpos en placas FAST® (Whatman Inc.; Florham Park, NJ). Se utilizan placas recubiertas con 8 bloques sectorizados. Tras la impresión se bloquean las placas con una solución de caseína al 3%. Las placas se guardan en condiciones secas antes del uso, al menos durante la noche.

Los criterios de selección de pacientes, métodos de preparación de muestras y diseño del estudio están adaptados a partir de estudios publicados que evalúan células tumorales circulantes en mujeres supuestamente afectadas de cáncer de mama (p.ej. Wulffing y otros, Clin. Cancer Res., 12:1715-1720 (2006); y Reinholz y otros, Clin. Cancer Res., 11:3722-3732 (2005)). Las mujeres con una anomalía pectoral detectada por imagen que deben someterse a una biopsia de mama son candidatas para este estudio. Al menos cuarenta y dos pacientes diagnosticadas de cáncer de mama primario están incluidas. Al menos treinta y cinco pacientes no tienen ningún signo manifiesto de metástasis en el momento del diagnóstico primario. Al menos siete pacientes tienen metástasis distantes en el momento del diagnóstico y se consideran como grupo de referencia positivo. Ninguna de las pacientes tiene historial previo de cáncer. Se anota de cada paciente la edad y la información sobre el tratamiento (p.ej. terapia quirúrgica, quimioterapia, radioterapia, terapia endocrina, etc.). Se recogen aproximadamente 20 ml de sangre de cada paciente y se asigna un número de identificación único a todas las muestras de sangre. Todos los ensayos se realizan sin que los investigadores conozcan los resultados de la biopsia.

Se añade sangre periférica (18 ml) a un sistema Accuspin Histopaque-1077 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO) y se centrifuga a 1.500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga de mesa Beckman CS-6R (Beckman Instruments; Palo Alto, CA). Se elimina la capa de células mononucleares, se lava dos veces con PBS y se diluye a 1 ml con PBS/ albúmina de suero bovino al 0,1%. Las células epiteliales se enriquecen por captura inmunomagnética mediante anticuerpos contra Ber-EP4 fijados a perlas magnéticas, empleando el kit Dynabeads Epithelial Enrich conforme a las instrucciones del fabricante (DynaL AS; Oslo, Noruega). Las células se mezclan con 1-107 perlas en un volumen de 20 ml agitando durante 1 hora. El anticuerpo Ber-EP4 reconoce dos glicoproteínas sobre la superficie y en el citoplasma de células epiteliales, excepto en las capas superficiales de células epiteliales escamosas, hepatocitos y células parietales. La suspensión se pone sobre un imán, al menos durante 6 minutos, y el sobrenadante se elimina cuidadosamente. Las células fijadas a las perlas magnéticas se lavan tres veces con 1 ml de PBS/ albúmina de suero bovino al 0,1%. Se añaden los factores de crecimiento TGF- $\alpha$  (100 nM), heregulina (100 nM) e IGF (100 nM) a las células y se incuban a 37°C durante 5 minutos. Las células se concentran y se lisan con el tampón de lisis/fijación suministrado con el kit. La suspensión del lisado celular (con las perlas fijadas) se almacena a -80°C hasta el procesamiento.

Método de ensayo 1: se aplican lisados (40  $\mu$ l) a la matriz, se incuban durante la noche y se lavan tres veces con tampón de lavado. Se añade a la matriz anticuerpo anti-fosfo marcado con HRP (conjugado del modo descrito p.ej. en Kuhlmann, Immuno Enzyme Techniques, Verlag Chemie, Weinheim, p. 1-162 (1984)) contra cada uno de los transductores de señales y anticuerpo anti-total (es decir, independiente del estado de activación) marcado con glucosa oxidasa (conjugado del modo descrito p.ej. en Kuhlmann, arriba citado), se incuban durante 2 horas y se lava tres veces con tampón de lavado. Se incorpora el reactivo de tiramida (Molecular Probes) y glucosa y la reacción se desarrolla durante 1 hora y se lava tres veces. La matriz se incuban con estreptavidina-HRP durante 30 minutos y se lava y desarrolla con luminol intensificado (Molecular Probes). La señal se detecta con una cámara CCD.

Método de ensayo 2: se transfieren anticuerpos (1 mg/ml) contra 2,4-dinitrofenol (DNP) a una placa de polipropileno de 384 pocillos (5  $\mu$ l/pocillo) empleando una micromatriz robótica de impresión de contacto (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA) provista de agujas sólidas para sembrar anticuerpos en placas FAST<sup>®</sup> (Whatman Inc.; Florham Park, NJ). Se utilizan placas recubiertas con 8 bloques sectorizados. Tras la impresión se bloquean las placas con una solución de caseína al 3%. Las placas se guardan en condiciones secas antes del uso, al menos durante la noche.

El lisado (40  $\mu$ l) se mezcla con anticuerpo total marcado con DNP contra cada uno de los transductores de señales arriba mencionados, anticuerpo anti-fosfo marcado con Oligo y Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 y anticuerpo anti-total marcado con Oligo y Alexa Fluor<sup>®</sup> 647, se añade a los anticuerpos anti-DNP, se incuban durante la noche y se lava tres veces con tampón de lavado. Se añade 2,4-dinitroisina (Molecular Probes) para liberar los inmunocomplejos de los anticuerpos anti-DNP. Los inmunocomplejos liberados se añaden a una matriz "código Zip" (véase p.ej. Keramas y otros, Lab Chip, 4:152-158 (2004); y Delrio-Lafreniere y otros, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 48:23-31 (2004)) y se incuban por la noche. La matriz se lava tres veces y la placas procesadas se examinan mediante un escáner de micromatrices GenePix 4000A (Axon Scanner) con una resolución de 10 micras.

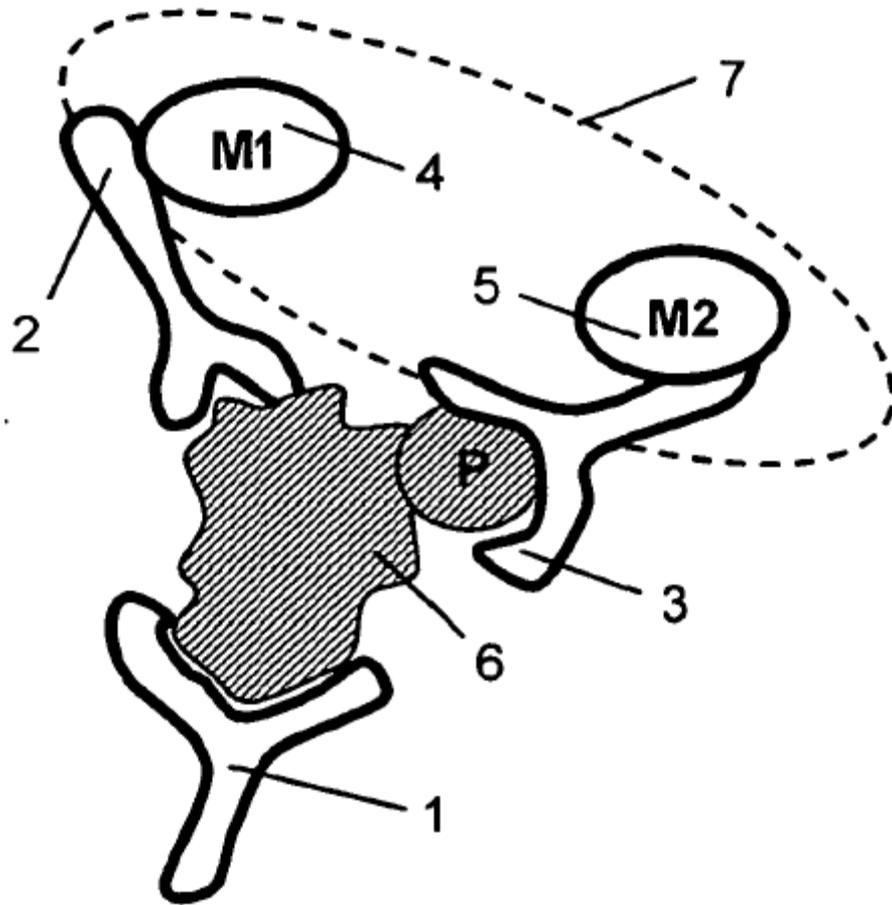
Ejemplo 10. Detección de la señalización de células endoteliales circulantes (CEC) y de células precursoras endoteliales circulantes (CEP) en pacientes de cáncer de mama.

Se emplean las mismas muestras de paciente, la misma preparación de muestras y los mismos métodos de ensayo descritos en el ejemplo 9, exceptuando que las células CEC y CEP se enriquecen por captura inmunomagnética mediante el anticuerpo monoclonal P1H12 o CD 146 fijado a perlas magnéticas Dynabeads. Se fabrica y procesa una micromatriz empleando los métodos descritos en el ejemplo 9, exceptuando que los anticuerpos seleccionados son específicos para los siguientes analitos: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, TIE1, TIE2, PDGFR- $\alpha$ , PDGFR- $\beta$ , FGFR1, FGFR2, Akt, Erk, p70S6K, Rsk, cSrc y  $\beta$ -actina. Los métodos de ensayo descritos en el ejemplo 9 se usan para detectar la señalización de CEC y CEP.

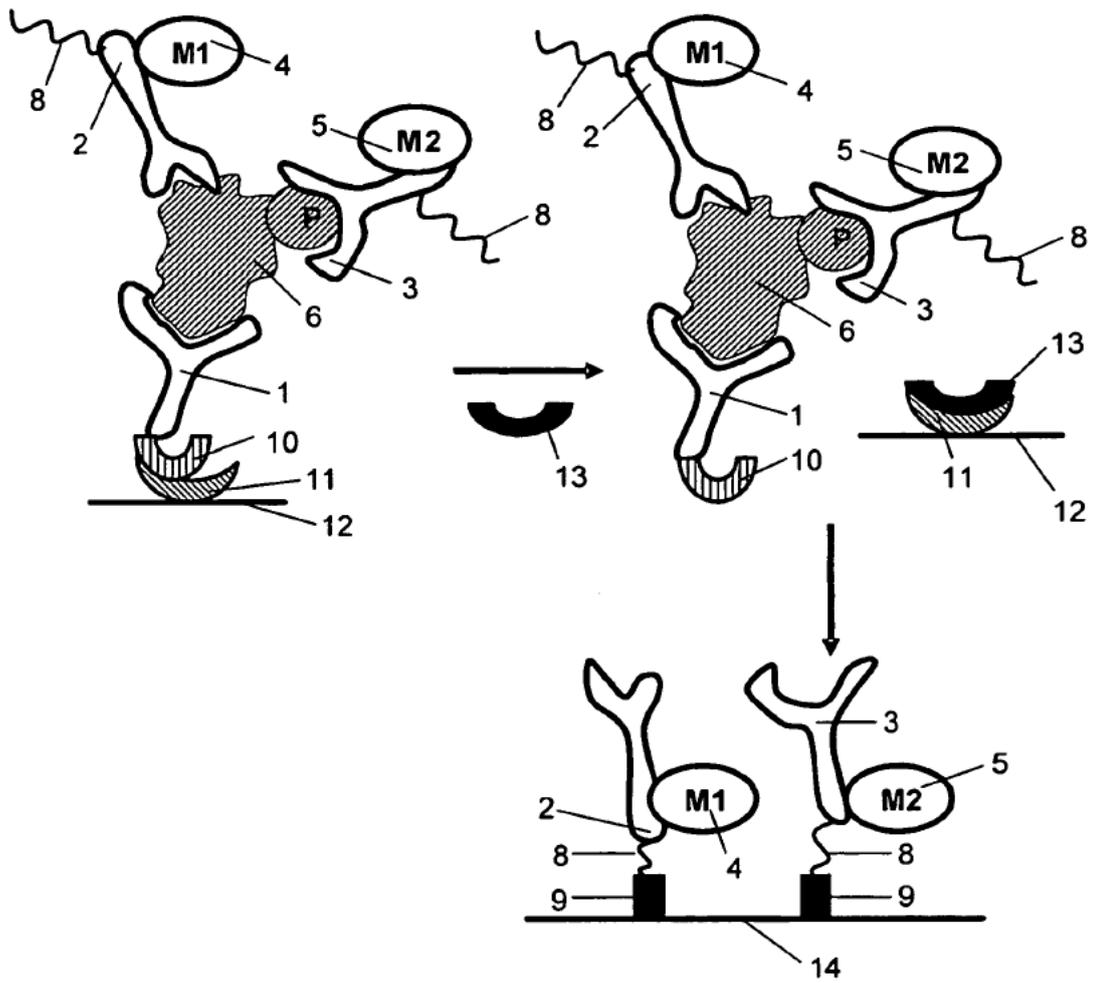
## REIVINDICACIONES

1. Método para realizar un inmunoensayo multiplex de alto rendimiento con rango dinámico superior, que consiste en:
- 5 (a) incubar un extracto celular con varias series de dilución de anticuerpos de captura específicos para uno o más analitos del extracto celular, a fin de formar varios analitos capturados, estando los anticuerpos de captura sujetos a un soporte sólido;
- (b) incubar todos los analitos capturados con anticuerpos detectores específicos de los respectivos analitos, para formar varios analitos capturados detectables, de modo que los anticuerpos detectores comprenden:
- 10 (1) varios anticuerpos independientes del estado de activación, marcados con glucosa oxidasa y
- (2) varios anticuerpos dependientes del estado de activación, marcados con un primer miembro de un par de amplificación de señal que es una peroxidasa,
- y la glucosa oxidasa genera peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que es canalizado hacia el primer miembro del par de amplificación de señal y reacciona con él;
- 15 (c) incubar todos los analitos capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señal, para generar una señal amplificada; y
- (d) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de señal.
2. El método de la reivindicación 1, en que el extracto celular comprende un extracto de células circulantes de un tumor sólido.
3. El método de la reivindicación 2, en que las células se aíslan de una muestra de un paciente por separación inmunomagnética.
- 25 4. El método de la reivindicación 3, en que la muestra del paciente se elige del grupo formado por sangre entera, suero, plasma, orina, esputos, líquido de lavado bronquioalveolar, lágrimas, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva, aspirado con aguja fina y combinaciones de las mismas.
5. El método de la reivindicación 3, en que las células aisladas se eligen del grupo constituido por células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales circulantes, células madre cancerosas y combinaciones de las mismas.
- 30 6. El método de la reivindicación 3, en el cual las células aisladas son i) estimuladas *in vitro* con factores de crecimiento o ii) incubadas con un fármaco anticáncer tal como un anticuerpo monoclonal, un inhibidor de tirosina cinasa, un agente inmunosupresor y combinaciones de ellos, antes de la estimulación con factor de crecimiento, y iii) lisadas tras la estimulación con factor de crecimiento para producir el extracto celular.
7. El método de la reivindicación 1, en que uno o más analitos comprenden varias moléculas transductoras de señales.
- 40 8. El método de la reivindicación 1, en que el soporte sólido se escoge del grupo formado por vidrio, plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membranas, haces de fibras y combinaciones de los mismos.
9. El método de la reivindicación 1, en que los anticuerpos independientes del estado de activación comprenden además un fragmento detectable tal como un fluoróforo.
- 45 10. El método de la reivindicación 9, en que la cantidad del fragmento detectable se correlaciona con la cantidad de uno o más analitos.
- 50 11. El método de la reivindicación 1, en que los anticuerpos dependientes del estado de activación van marcados directamente con glucosa oxidasa.
12. El método de la reivindicación 1, en que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con glucosa oxidasa mediante la hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con glucosa oxidasa.
- 55 13. El método de la reivindicación 1, en que los anticuerpos dependientes del estado de activación van marcados directamente con el primer miembro del par amplificador de la señal.
- 60 14. El método de la reivindicación 1, en que los anticuerpos dependientes del estado de activación van marcados con el primer miembro del par amplificador de la señal mediante la unión entre un primer miembro de un par de fijación, tal como biotina, conjugado con los anticuerpos dependientes del estado de activación, y un segundo miembro del par de fijación, tal como estreptavidina, conjugado con el primer miembro del par amplificador de la señal.

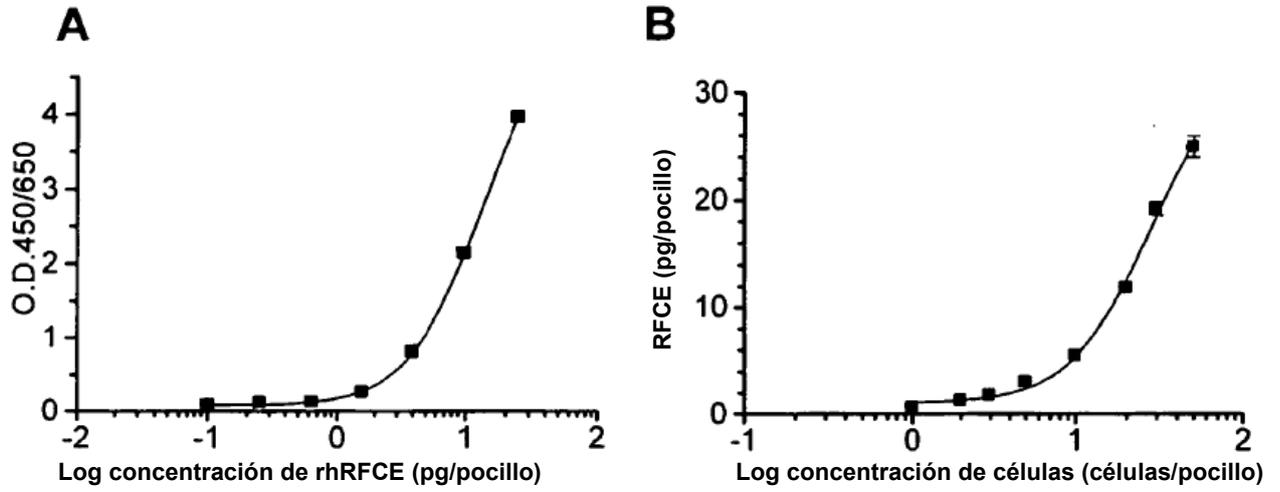
15. El método de la reivindicación 1, en que la peroxidasa es peroxidasa de rábano picante HRP).
16. El método de la reivindicación 14, en que el segundo miembro del par amplificador de la señal es un reactivo de tiramida tal como biotina-tiramida.
- 5 17. El método de la reivindicación 16, en que la señal amplificada es generada mediante la oxidación de la biotina-tiramida por peroxidasa, para producir una tiramida activada.
- 10 18. El método de la reivindicación 17, en que la tiramida activada se detecta directamente.
19. El método de la reivindicación 17, en que la tiramida activada es detectada tras la adición de un reactivo detector de señales, tal como un fluoróforo marcado con estreptavidina.
- 15 20. El método de la reivindicación 19, en el cual el reactivo detector de señales es una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico tal como 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).



**FIG. 1**



**FIG. 2**

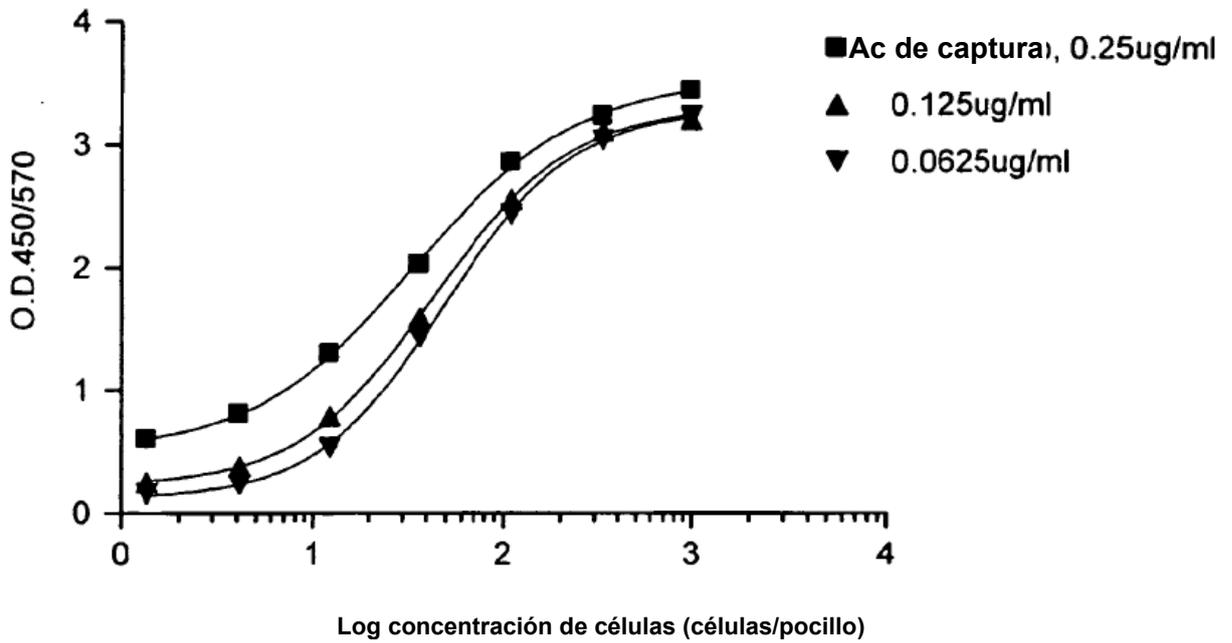


**C**

Células/pocillo	RFCE (pg/pocillo)	RFCE (pg/pocillo)
50	25.00 ± 1.40	0.50
30	19.20 ± 0.83	0.64
20	11.87 ± 0.08	0.59
10	5.49 ± 0.251	0.55
5	3.00 ± 0.016	0.60
3	1.75 ± 0.019	0.58
2	1.28 ± 0.068	0.64
1	0.66 ± 0.012	0.66

**FIG. 3**

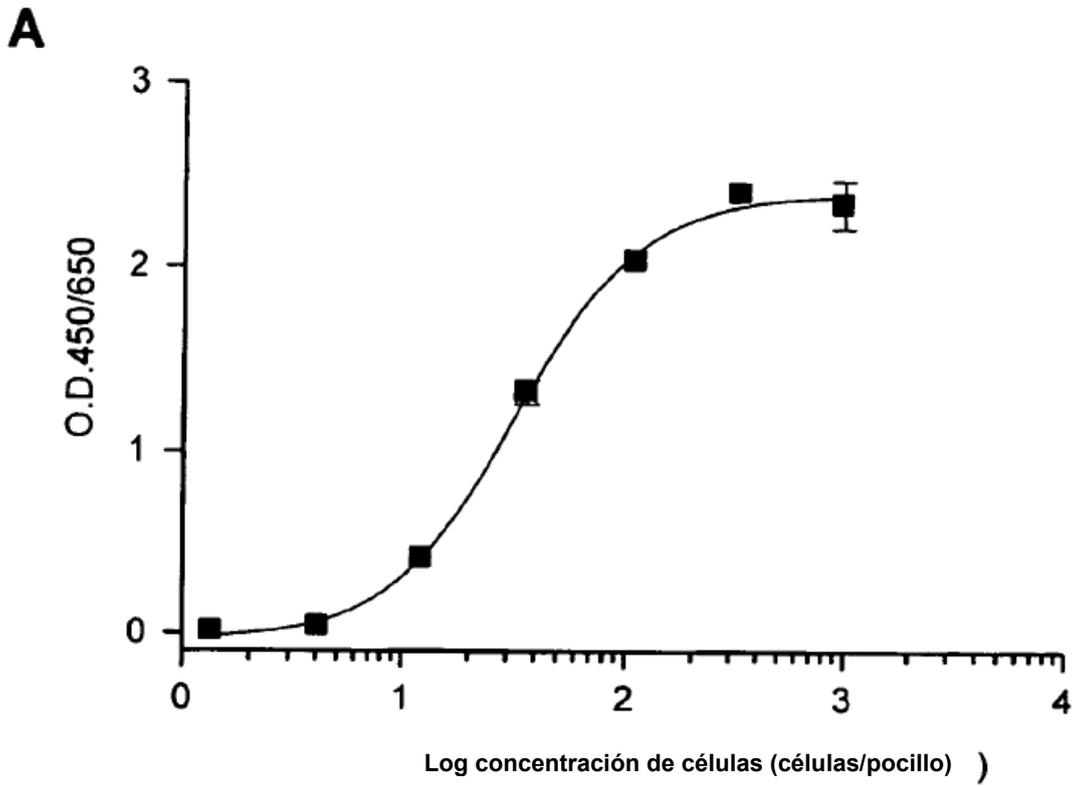
**A**



**B**

Relación S/N Células/pocillo	Concentración de Ac de captura		
	0.25ug/ml	0.125ug/ml	0.0625ug/ml
1,000	9.10	19.71	36.12
333	8.57	19.17	34.02
111	7.58	15.70	27.27
37	5.38	9.81	16.15
12	3.47	4.88	5.98
4	2.16	2.33	2.60
1	1.60	1.53	1.78
0	1.00	1.00	1.00

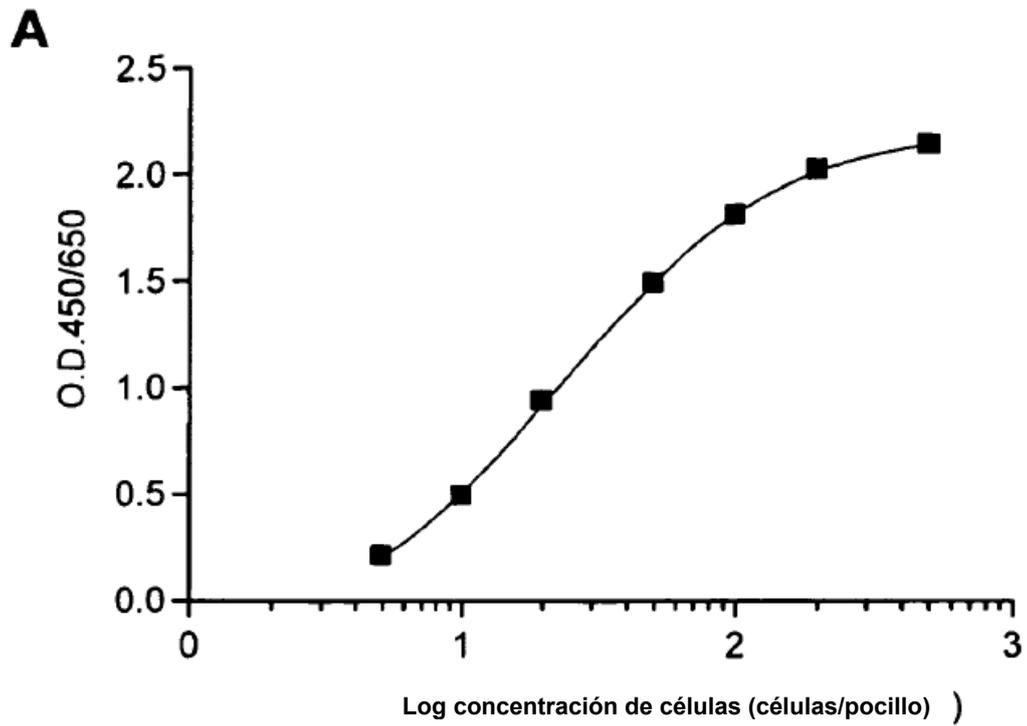
**FIG. 4**



**B**

Células/pocillo	O.D. 450/650		Media	Relación S/N
1,000.00	2.47	2.208	2.339	668.29
333.33	2.432	2.363	2.3975	685.00
111.11	2.019	2.048	2.0335	581.00
37.04	1.255	1.386	1.3205	377.29
12.35	0.393	0.435	0.414	118.29
4.12	0.04	0.037	0.0385	11.00
1.37	0.012	0.007	0.0095	2.71
0	0.004	0.003	0.0035	1.00

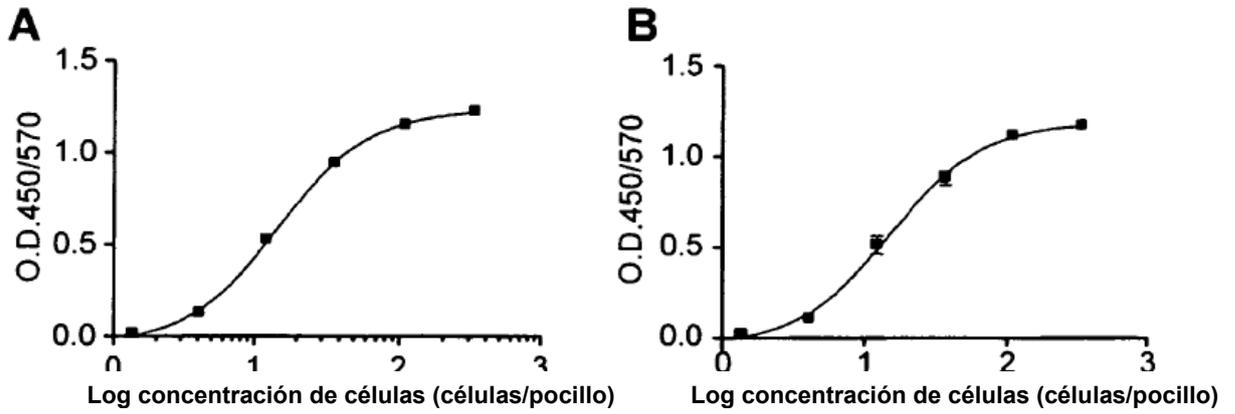
**FIG. 5**



**B**

Células/pocillo	O.D. 450/650		Relación S/N
500	2.135	2.143	30.56
200	2.002	2.035	28.84
100	1.796	1.818	25.81
50	1.489	1.483	21.23
20	0.956	0.915	13.36
10	0.495	0.487	7.01
5	0.208	0.216	3.03
0	0.07	0.07	1.00

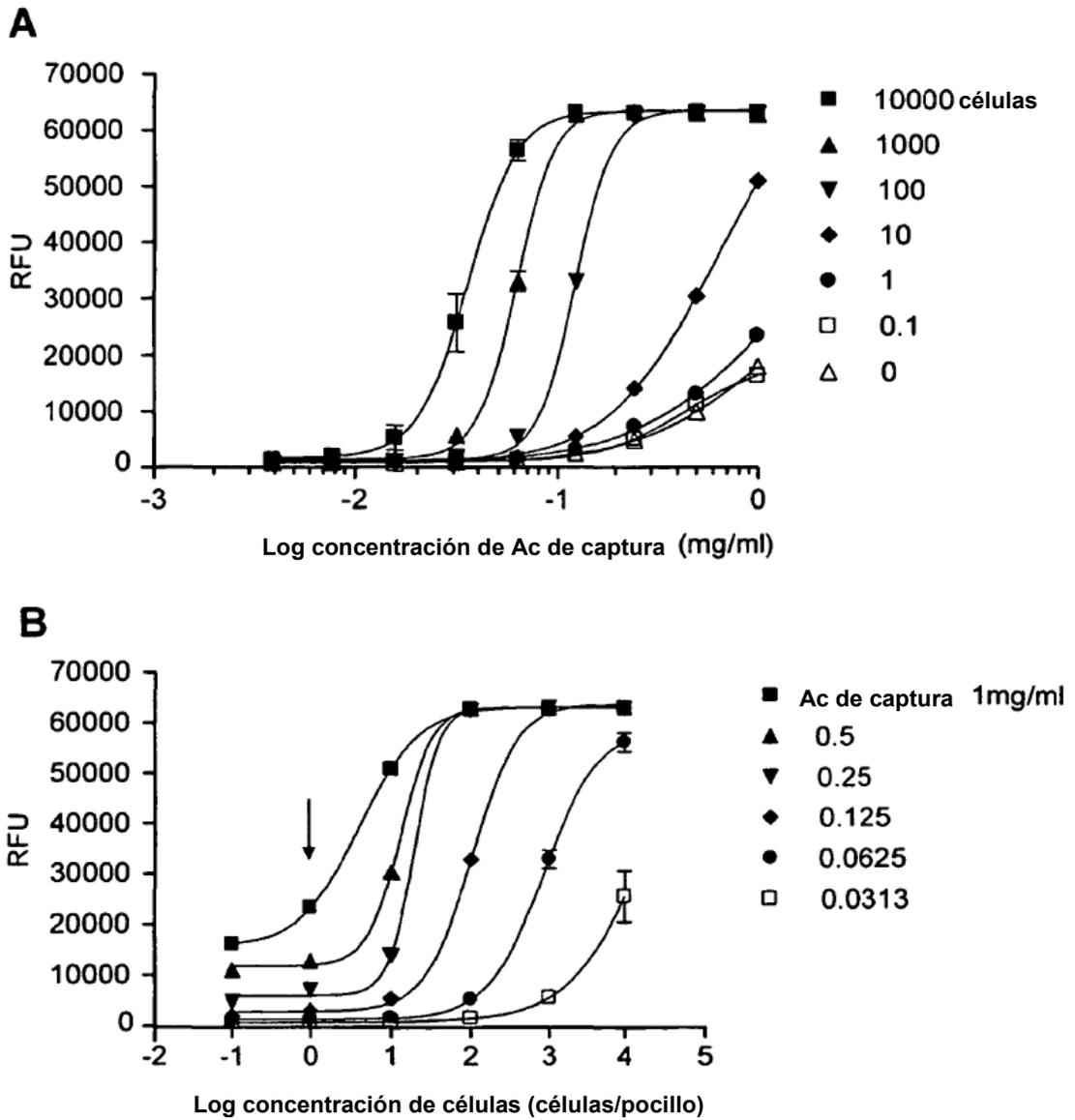
**FIG. 6**



**C**

Células	Erk2 total			Fosfo-Erk2		
Células/pocillo)	(O.D.450/570)		Relación S/N	(O.D.450/570)		Relación S/N
1000	1.097	1.076	271.63	1.086	1.054	356.67
333.3333	1.241	1.214	306.88	1.193	1.144	389.50
111.1111	1.163	1.141	288.00	1.136	1.087	370.50
37.03704	0.958	0.923	235.13	0.913	0.838	291.83
12.34568	0.52	0.533	131.63	0.555	0.455	168.33
4.115226	0.114	0.139	31.63	0.102	0.093	32.50
1.371742	0.016	0.01	3.25	0.012	0.007	3.17
0	0.004	0.004	1.00	0.003	0.003	1.00

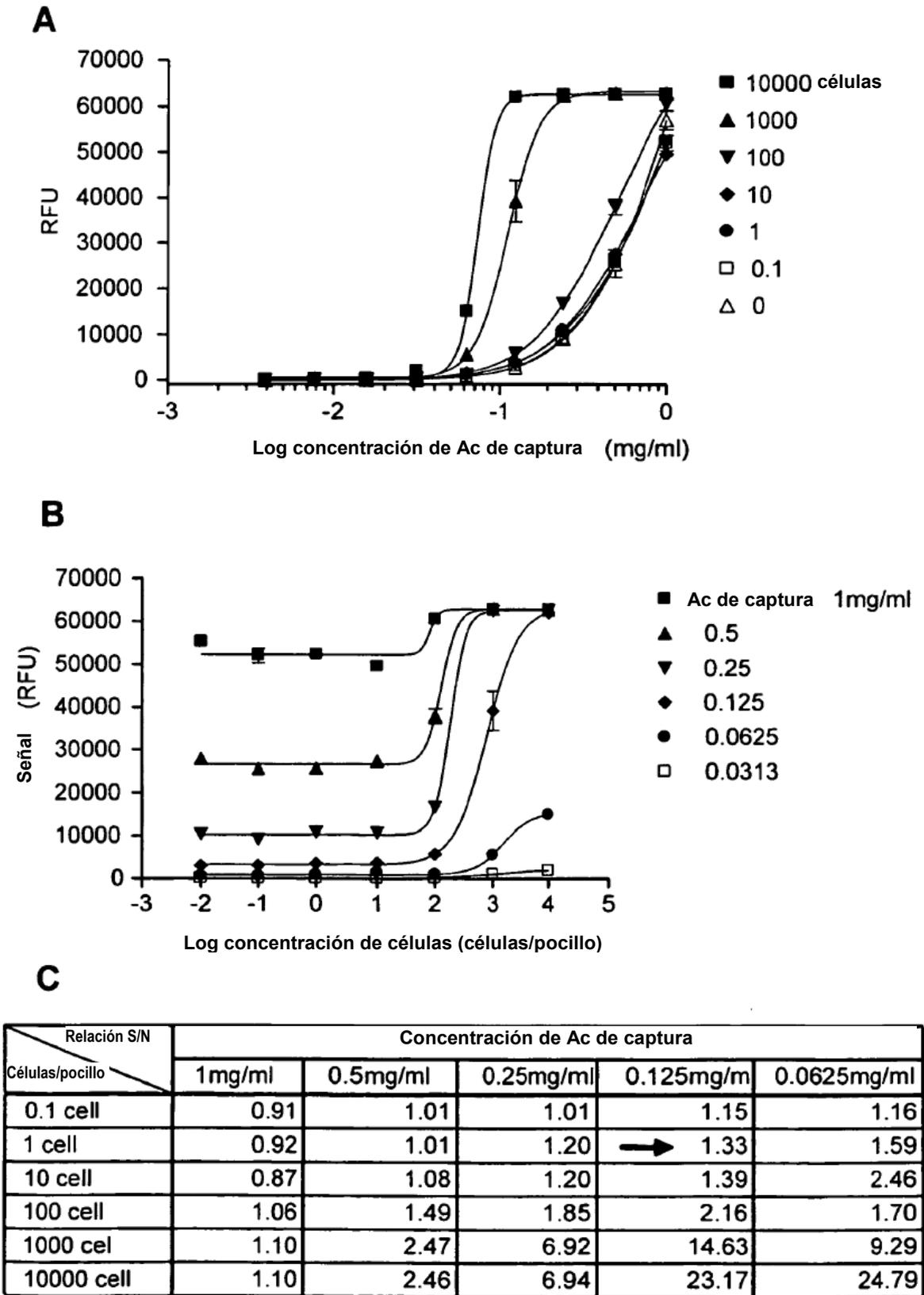
**FIG. 7**



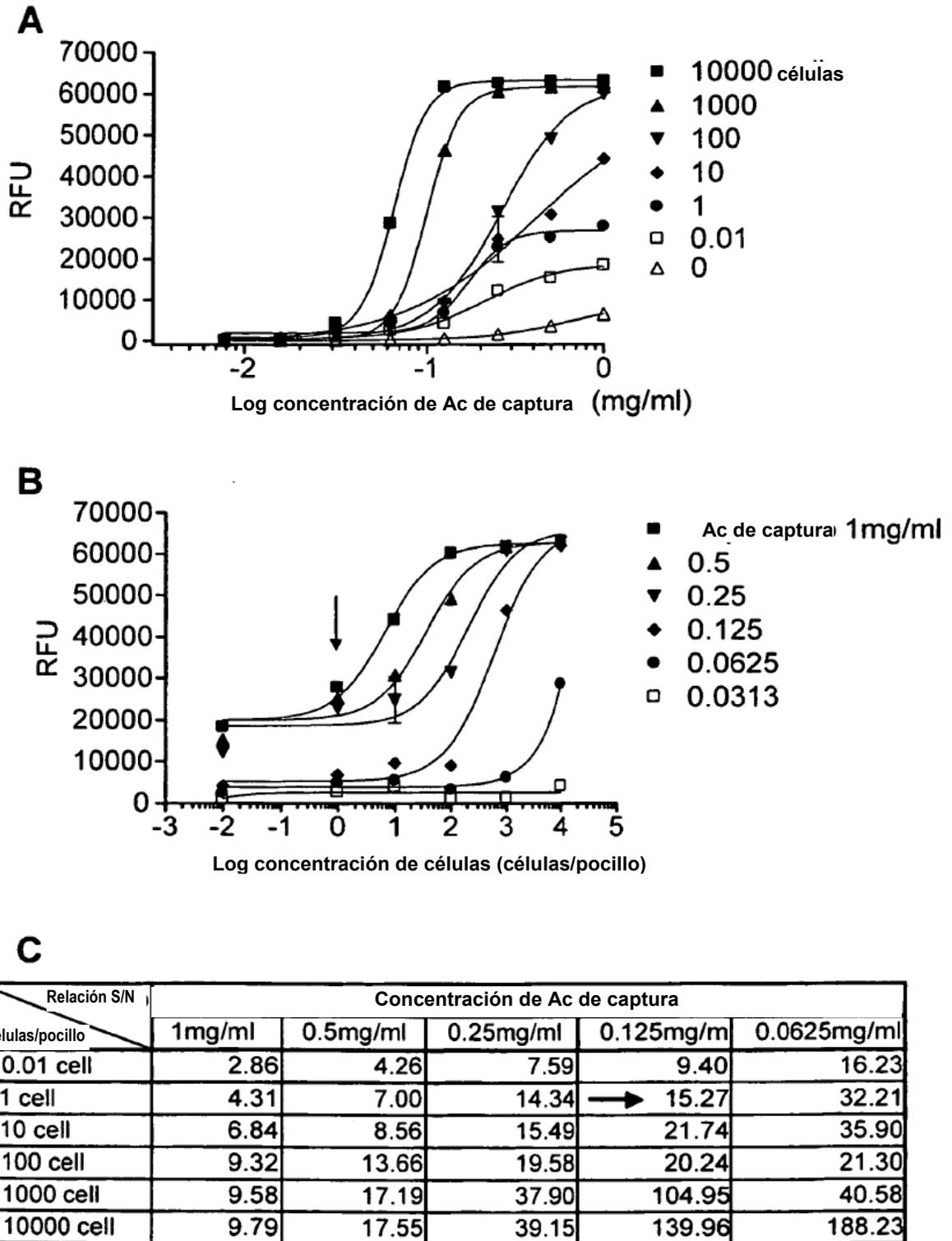
**C**

Relación S/N Células/pocillo	Concentración de Ac de captura				
	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/m	0.125mg/ml	0.0625mg/ml
0.1 cell	0.90	1.15	1.03	0.86	1.17
1 cell	1.32	1.35	1.59	1.50	→ 2.11
10 cell	2.94	3.30	3.30	3.07	3.14
100 cell	3.64	6.95	15.52	21.35	16.52
1000 cell	3.63	6.96	15.69	41.34	118.78
10000 cell	3.66	6.98	15.63	41.57	204.97

**FIG. 8**

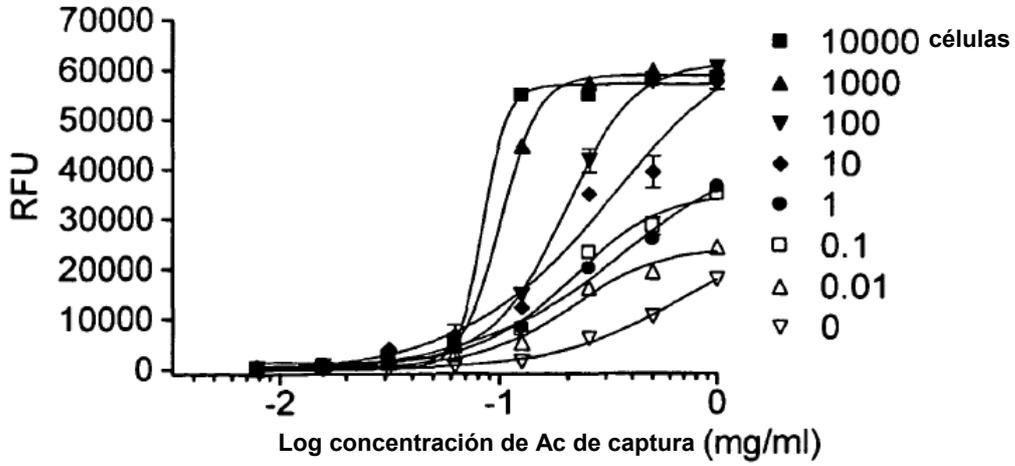


**FIG. 9**

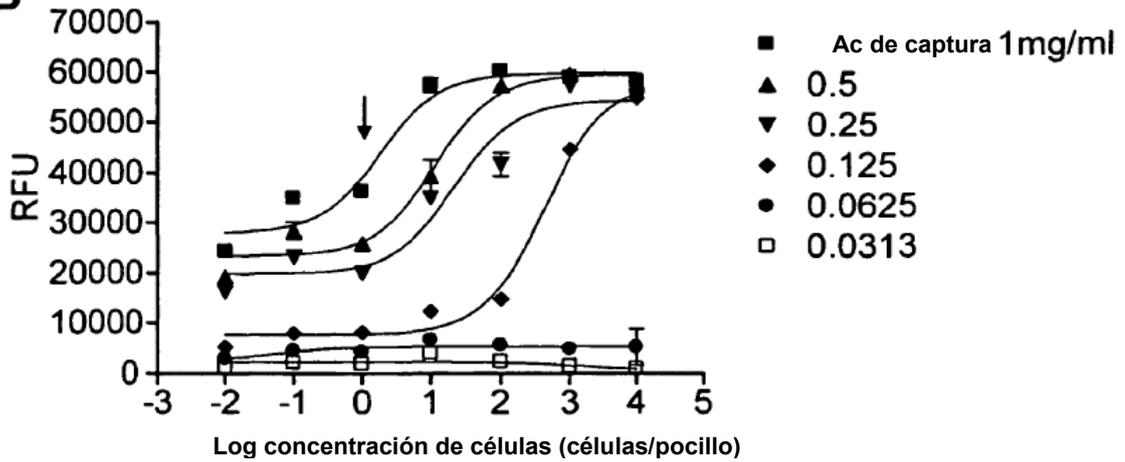


**FIG. 10**

**A**



**B**



**C**

Relación S/N Células/pocillo	Concentración de Ac de captura				
	1mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml	0.125mg/ml	0.0625mg/ml
0.01 cell	1.36	1.87	2.69	3.47	5.22
0.1 cell	1.95	2.74	3.86	5.24	8.01
1 cell	2.04	2.49	3.34	→ 5.45	7.62
10 cell	3.21	3.79	5.81	8.21	11.72
100 cell	3.37	5.54	6.93	9.86	9.99
1000 cell	3.29	5.75	9.54	29.81	8.53
10000 cell	3.26	5.59	9.11	36.63	9.34

**FIG. 11**

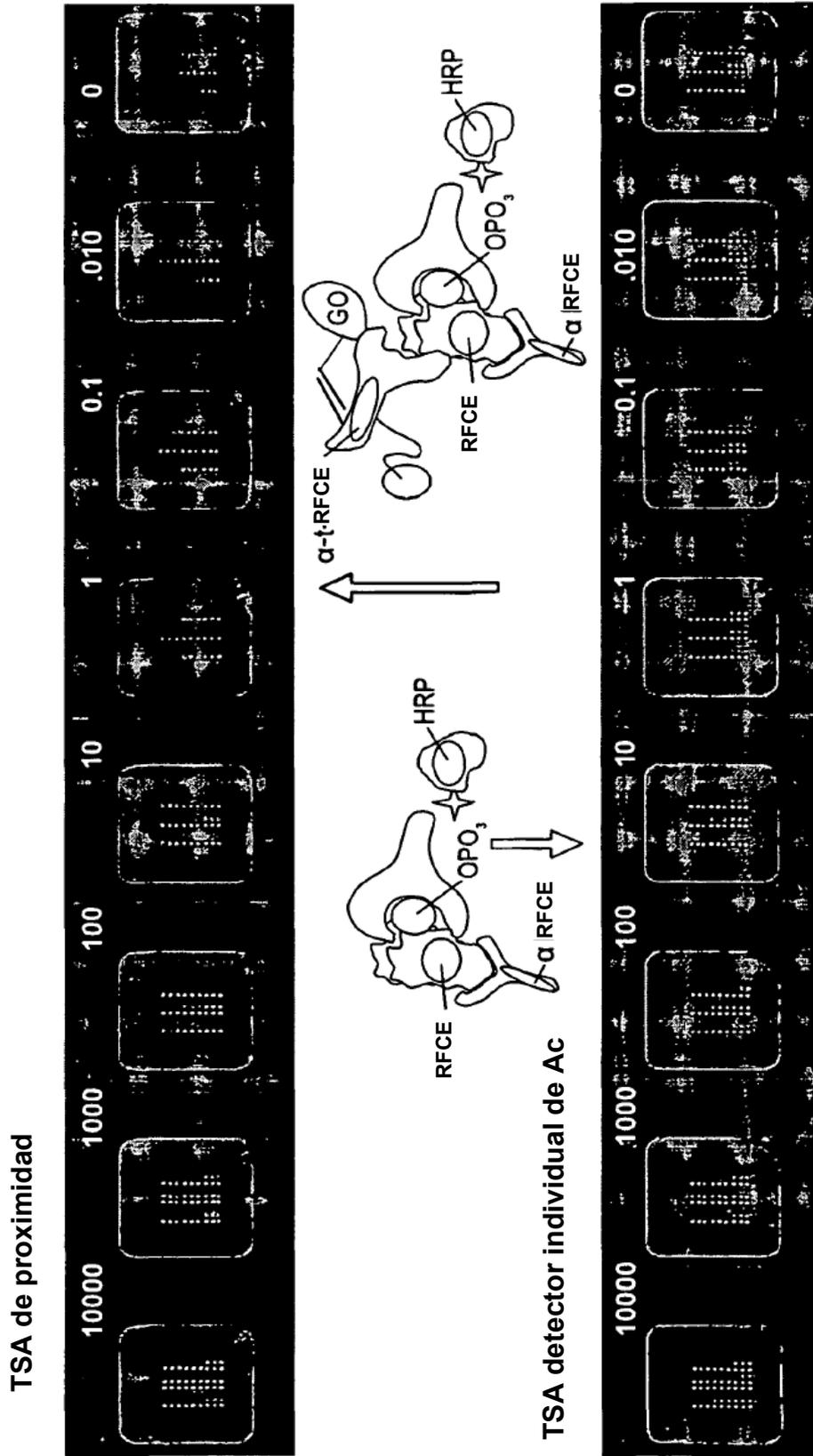


FIG. 12

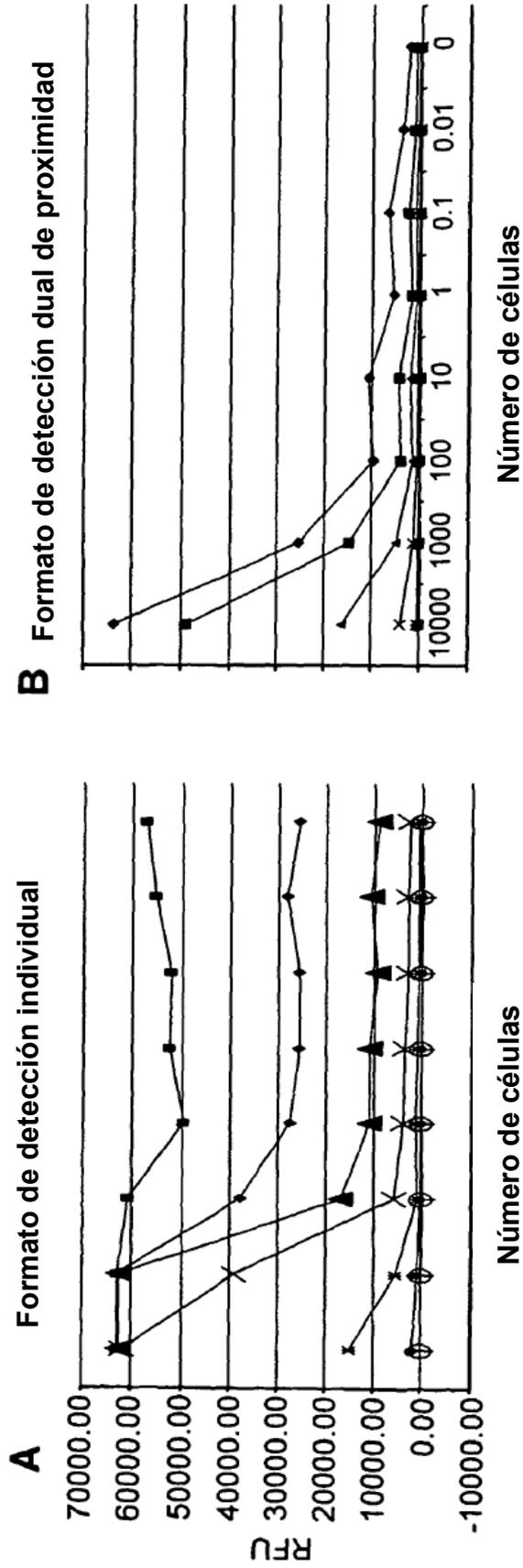
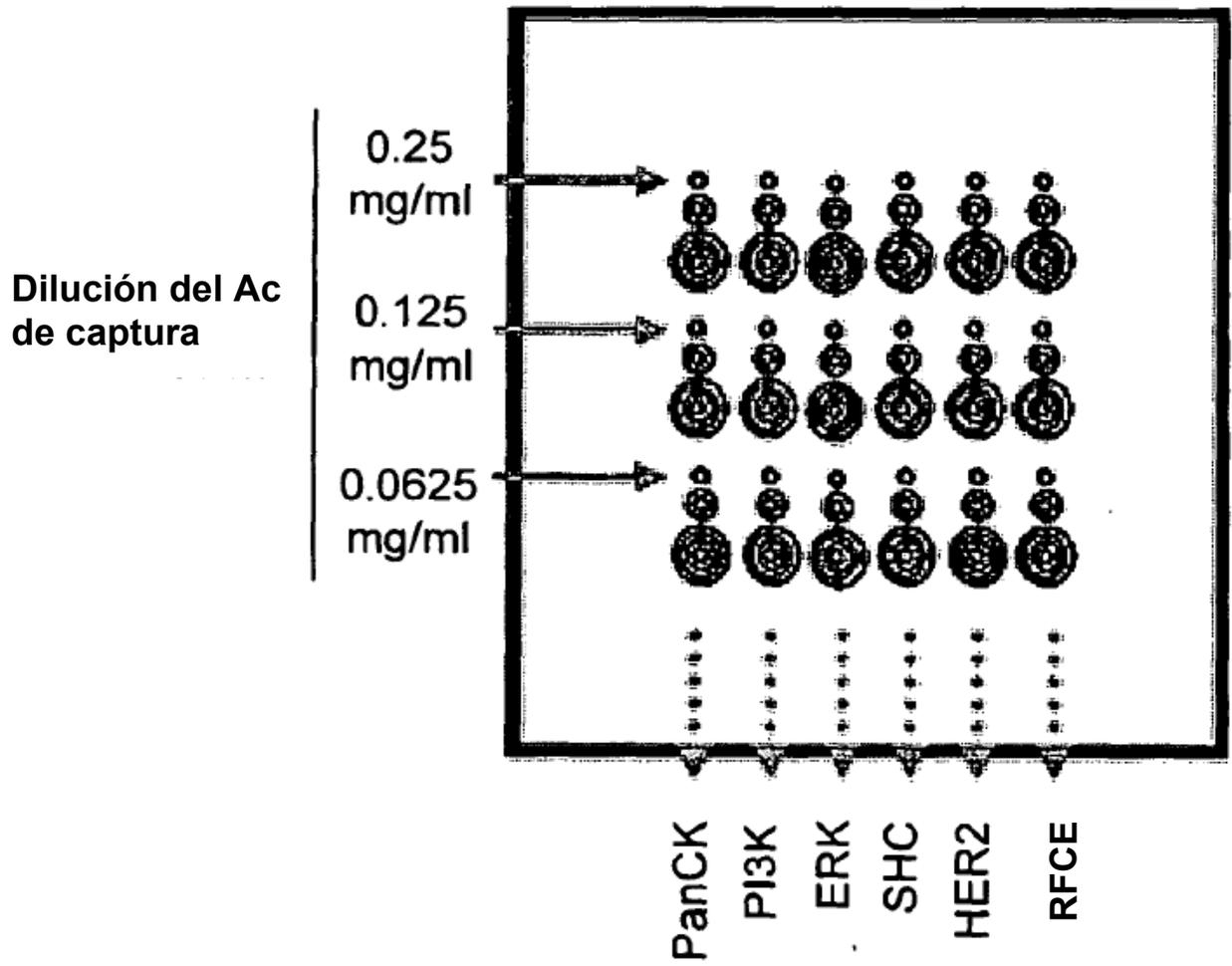
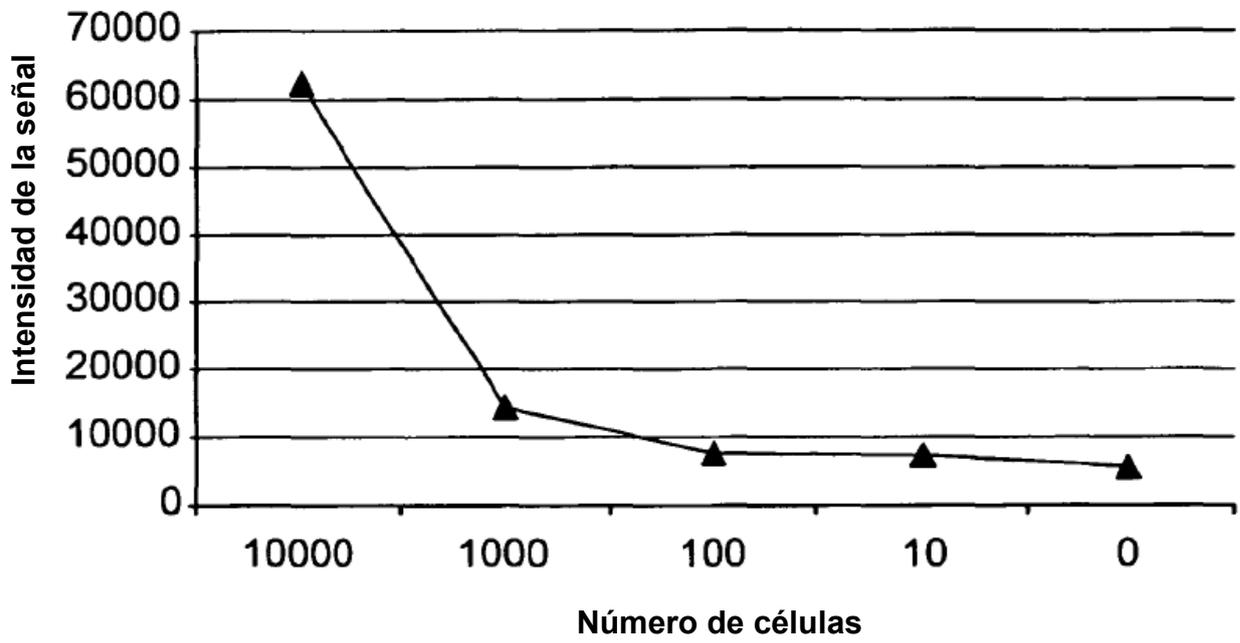


FIG. 13

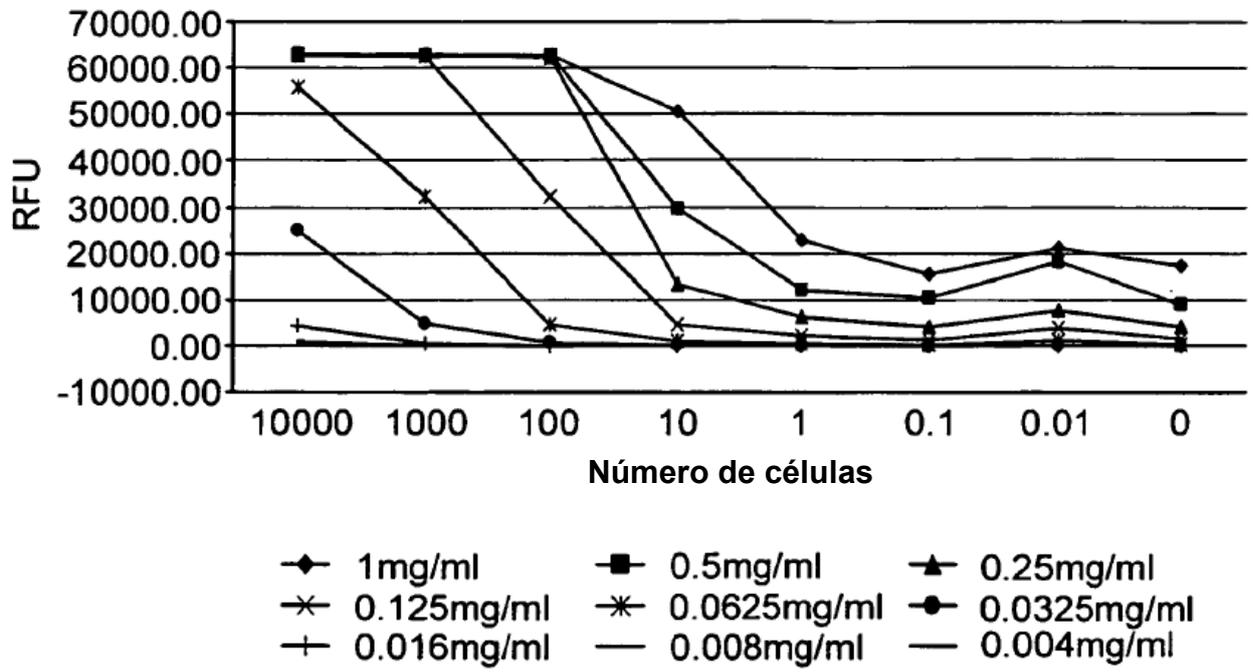


**FIG. 14**

**Valoración de células A431**

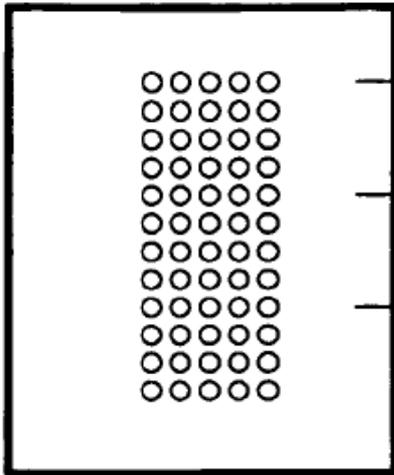


**FIG. 15**



**FIG. 16**

**A**



GO-oligo fracción 7 a 9 – 50 g/ml

Dilución 10X en serie

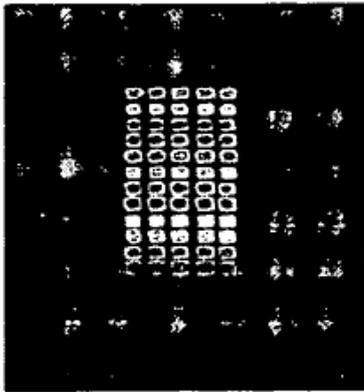
GO-oligo fracción 10 a 12 – 50 g/ml

Dilución 10X en serie

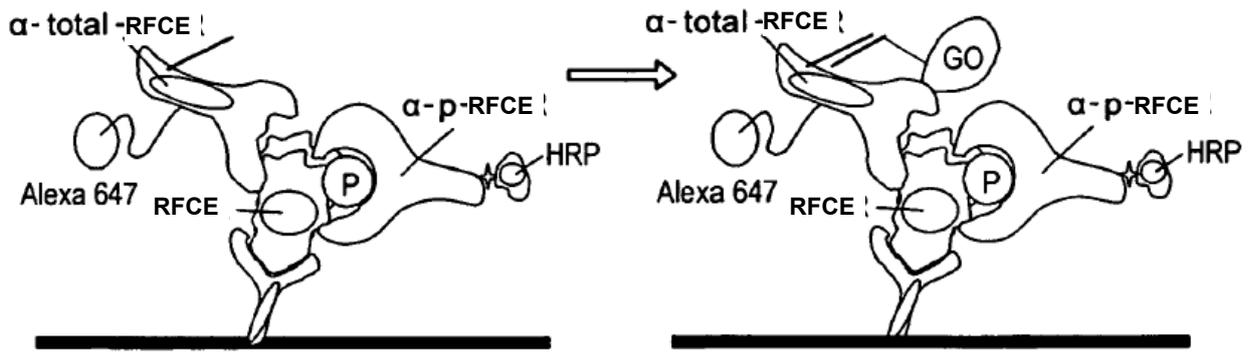
GO-oligo fracción 13 a 15 – 50 g/ml

Dilución 10X en serie

**B**

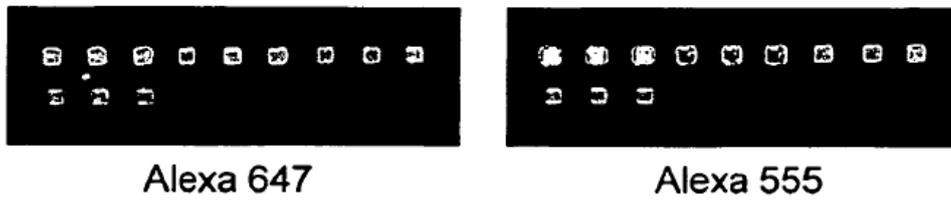


**FIG. 17**

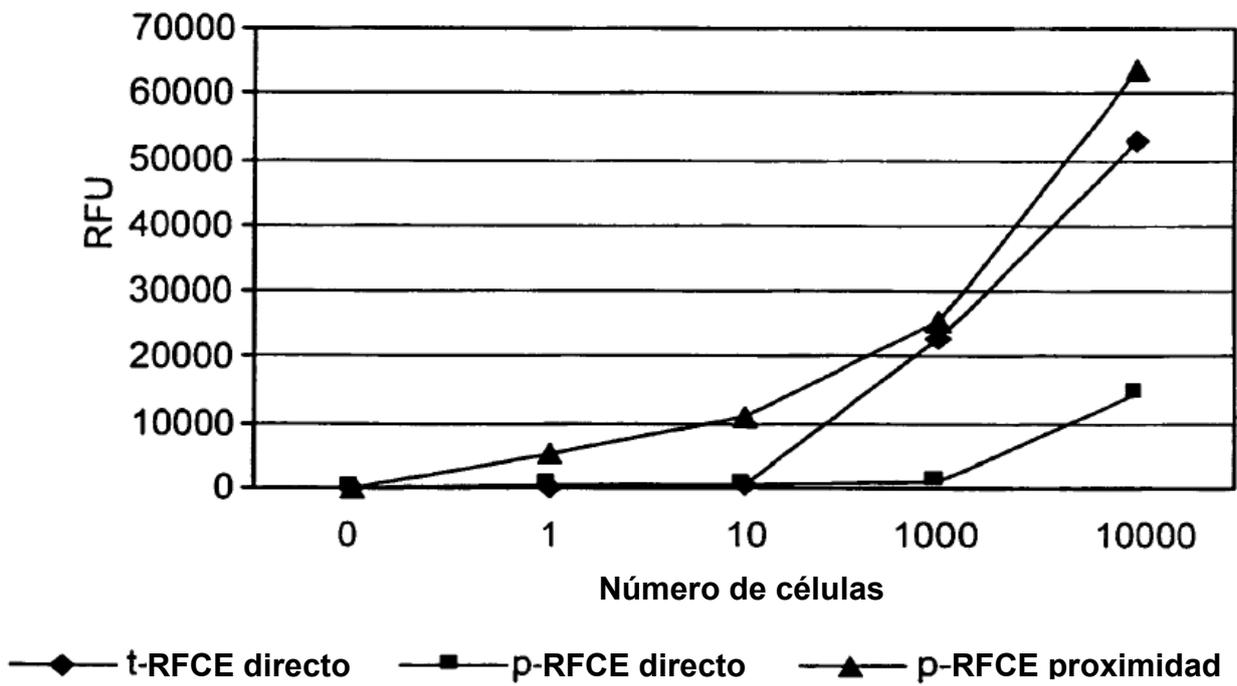


**FIG. 18**

**A**



**B**



**FIG. 19**