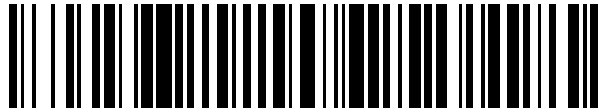


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 884**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2004 E 04759064 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1613205**

54 Título: **Complejos de receptores de superficie ErbB como biomarcadores**

30 Prioridad:

01.04.2003 US 459888 P
17.07.2003 US 623057
11.08.2003 US 494482 P
01.10.2003 US 508034 P
20.10.2003 US 512941 P
18.11.2003 US 523258 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.09.2013

73 Titular/es:

MONOGRAM BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
345 Oyster Point Boulevard
South San Francisco, CA 94080-1913, US

72 Inventor/es:

CHAN-HUI, PO-YING;
SALIMI-MOOSAVI, HOSSEIN;
SHI, YINING;
SINGH, SHARAT;
DUA, RAJIV;
MUKHERJEE, ALI y
PIDAPARTHI, SAILAJA

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 422 884 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

Complejos de receptores de superficie ErbB como biomarcadores

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en términos generales, a unos biomarcadores, y más concretamente, al uso como biomarcadores de complejos de receptores de superficie celular ErbB, tales como dímeros y oligómeros.

Antecedentes de la invención

10 Un biomarcador es una característica que se mide y evalúa de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica, Atkinson et al, Clin. Pharmacol. Ther., 69: 89-95 (2001). Los biomarcadores varían en gran medida por lo que respecta a su naturaleza, facilidad de medición y correlación con estados fisiológicos de interés, por ejemplo Frank et al, Nature Reviews Drug Discovery, 2: 566-580 (2003). En general, se cree que el desarrollo de nuevos biomarcadores validados conducirá tanto a una reducción significativa de los costes de desarrollo de fármacos y sanitarios como a importantes mejoras en el tratamiento de diversas enfermedades y condiciones. Por ello, se ha dedicado un gran esfuerzo al uso de las nuevas tecnologías para encontrar nuevas clases de biomarcadores, por ejemplo Petricoin et al, Nature Reviews Drug Discovery, 1: 683-695 (2002); Sidransky, Nature Reviews Cancer, 2: 210-219 (2002).

15 Las interacciones de los componentes de la membrana de la superficie celular desempeñan funciones fundamentales para transmitir señales extracelulares a una célula, tanto en la fisiología normal como en estados patológicos. En particular, muchos tipos de receptores de superficie celular se someten a dimerización, oligomerización o agrupación en relación con la transducción de una señal o evento extracelular, por ejemplo la unión de ligando-receptor, en una respuesta celular, como la proliferación, el aumento o la disminución de la expresión genética o similares, por ejemplo George et al, Nature Reviews Drug Discovery, 1: 808-820 (2002); Mellado et al, Ann. Rev. Immunol., 19: 397-421 (2001); Schlessinger, Cell, 103: 211-225 (2000); Yarden, Eur. J. Cancer, 37: S3-S8 (2001). La función de estos eventos de transducción de señales en las enfermedades, como el cáncer, ha sido objeto de una intensa investigación y ha conducido al desarrollo de varios fármacos nuevos y fármacos candidatos, por ejemplo Herbst y Shin, Cancer, 94: 1593-1611 (2002); Yarden y Sliwkowski, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2: 127-137 (2001); McCormick, Trends in Cell Biology, 9: 53-56 (1999); Blume-Jensen y Hunter, Nature, 411: 355-365 (2001).

20 Los niveles de expresión de los receptores de superficie celular individuales se han empleado con éxito como biomarcadores, por ejemplo Slamon et al, Patente estadounidense 4.968.603 (expresión de Her2). Sin embargo, el nivel de expresión del receptor individual por sí solo no siempre es un indicador fiable de una condición o estado patológico, por ejemplo Chow et al, Clin. Cancer Res., 7: 1957-1962 (2001) (EGFR, o Her1, expresión). A pesar de la importante función que desempeña la dimerización del receptor en los procesos celulares y patológicos, la expresión del dímero del receptor no se ha empleado como biomarcador, en parte debido a la incomodidad y a la falta de sensibilidad de las actuales tecnologías de medición y a la incapacidad o inviabilidad del uso de estas tecnologías para realizar mediciones sobre muestras de pacientes, que pueden estar fijadas en formalina y/o presentar una cantidad demasiado pequeña para el análisis, por ejemplo Price et al, Methods in Molecular Biology, 218: 255-267 (2003); Stagljjar, Science STKE 2003, pe56 (2003); Koll et al, Publicación de patente internacional WO 2004/008099; Golemis, editor, Protein-Protein Interactions (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2002); Sorkin et al, Curr. Biol., 10: 1395-1398 (2000); McVey et al, J. Biol. Chem., 17: 14092-14099 (2001); Salim et al, J. Biol. Chem., 277: 15482-15485 (2002); Angers et al, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 42: 409-435 (2002); Szollosi et al, Reviews in Molecular Biotechnology, 82: 251 -266 (2002); Matko et al, Meth. in Enzymol., 278: 444-462 (1997); Reed-Gitomer, Patente estadounidense 5.192.660.

25 En vista de lo anterior, la disponibilidad de una nueva clase de biomarcadores en las muestras de los pacientes basados en la presencia, ausencia y/o perfil o ratios de dímeros de receptores de superficie celular o complejos implicados en procesos intracelulares clave, como la transducción de la señal, supondrían un avance en el campo de la medicina, al proporcionar una nueva herramienta para el diagnóstico, pronóstico, estratificación del paciente y desarrollo de fármacos.

US - A - 6001583 divulga la utilidad de los complejos de Her2-GRB7 como marcador del cáncer.

30 Gilbertson et al., CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 57, no. 15, 1 de agosto de 1997 (1997-08-01), páginas 3272-3280 divulga la asociación de la supervivencia de los pacientes que sufren un meduloblastoma infantil y la coexpresión de Her 2 y Her 4.

Bazin H et al., JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 82, no. 3, 1 de enero de 2002, páginas 233-250 divulga los complejos del receptor Her y su potencial uso como marcador conjuntamente con el cáncer.

WO 2004 08099 que es pertinente en virtud del art. 54(3) del CPE solamente, se refiere a la detección de complejos de la proteína Her 1/Her 2 y/o Her 2/Her 3 para determinar el grado de respuesta de un cáncer.

Resumen de la invención

5 La invención se refiere a un método mencionado en la reivindicación 1. La divulgación proporciona biomarcadores que comprenden complejos de receptores ErbB en las membranas de la superficie celular de las muestras de tejido o células de un paciente, particularmente las muestras conservadas mediante procedimientos convencionales, como la congelación o fijación. En un aspecto, la divulgación incluye un método para determinar el estado de una enfermedad o condición saludable, correlacionando esta condición con las cantidades de uno o más complejos de receptores ErbB en las membranas de la superficie celular de una muestra de tejido o células de un individuo. En otro aspecto, la divulgación incluye un método para determinar un estado de cáncer en una muestra de un individuo, correlacionando las mediciones de las cantidades de uno o más complejos de receptores de superficie ErbB en la muestra con dicho estado. La invención proporciona asimismo un método para predecir la efectividad de los fármacos que actúan sobre el dímero de ErbB, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, relacionando las cantidades y los tipos de dímeros de ErbB que responden a los fármacos con la eficacia o una probabilidad de respuesta del paciente.

15 En un aspecto, la invención permite determinar un estado patológico de un paciente que sufre una enfermedad caracterizada por una expresión aberrante de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB, a través de los pasos siguientes: (i) medición de una cantidad de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB en una muestra de un paciente, tal y como se menciona en la reivindicación 1 (ii) comparación de esta cantidad con su correspondiente cantidad en una muestra de referencia; y (iii) correlación de las diferencias en las cantidades de la muestra del paciente con las correspondientes cantidades de la muestra de referencia para el estado patológico del paciente. Una muestra de un paciente puede ser fijada o congelada; no obstante, preferiblemente, una muestra de un paciente se fija utilizando protocolos convencionales.

25 En un aspecto concreto, la divulgación proporciona un método para determinar a partir de las mediciones en muestras de pacientes, especialmente muestras fijadas, el estado patológico de un paciente que sufre un cáncer, donde dicha medición se realiza de los tipos y/o cantidades de complejos de receptores ErbB, que también se denominan en el presente «complejos de receptores Her». Estos complejos de receptores incluyen, a título meramente enunciativo, uno o más homodímeros de Her1-Her1, homodímeros de Her2-Her2, dímeros del receptor Her1-Her2, dímeros del receptor Her2-Her3, dímeros del receptor Her1-Her3, dímeros del receptor Her2-Her4, complejos de Her1-PI3K, complejos de Her2-PI3K, complejos de Her3-PI3K, complejos de Her1-SHC, complejos de Her2-SHC, complejos de Her3-SHC, dímeros del receptor Her1-IGF-1R, dímeros del receptor Her2-IGF-1R, dímeros del receptor Her3-IGF-1R, dímeros del receptor Her1-PDGFR, dímeros del receptor Her2-PDGFR, dímeros del receptor Her3-PDGFR, dímeros del receptor p95Her2-Her3, dímeros del receptor p95Her2-Her2, dímeros del receptor p95Her2-Her1, dímeros del receptor EGFRvIII-Her1, dímeros del receptor EGFRvIII-Her2, y dímeros del receptor EGFRvIII-Her3. En otras realizaciones, estos complejos del receptor Her se seleccionan del grupo compuesto por dímeros del receptor Her1-Her2 y dímeros del receptor Her2-Her3; o del grupo compuesto por dímeros del receptor Her1-Her2, dímeros del receptor Her2-Her3, y dímeros del receptor Her1-Her3. En otra realización, la divulgación incluye la medición de complejos que comprenden un receptor Her en una molécula adaptadora intracelular, en particular moléculas adaptadoras intracelulares que forman complejos con un receptor Her en respuesta a la fosforilación de dicho receptor. Algunos ejemplos de complejos de receptores Her y moléculas adaptadoras intracelulares incluyen los complejos seleccionados del grupo compuesto por los complejos de Her1-PDK, complejos de Her2-PI3K, complejos de Her3-PI3K, complejos de Her1-SHC, complejos de Her2-SHC, y complejos de Her3-SHC. La divulgación incluye asimismo la asociación de heterodímeros del receptor que comprenden un receptor Her y otro receptor de tirosina quinasa con un estado patológico. Algunos ejemplos de complejos de receptores Her y otro receptor de tirosina quinasa incluyen los complejos de receptores seleccionados del grupo compuesto por dímeros del receptor Her1-IGF-1R, dímeros del receptor Her2-IGF-1R, dímeros del receptor Her3-IGF-1R, dímeros del receptor Her1-PDGFR, dímeros del receptor Her2-PDGFR, y dímeros del receptor Her3-PDGFR. La divulgación incluye asimismo la asociación de dímeros del receptor que comprenden un receptor Her de longitud completa y un receptor Her truncado con un estado patológico. Algunos ejemplos de complejos de receptores Her de longitud completa y receptores Her truncados incluyen los complejos de receptores seleccionados del grupo compuesto por dímeros del receptor p95Her2-Her3, dímeros del receptor EGFRvIII-Her1, dímeros del receptor EGFRvIII-Her2, y dímeros del receptor EGFRvIII-Her3. En otro aspecto, este método para determinar el estado patológico incluye la determinación de la efectividad de los fármacos que actúan sobre los dímeros, o el grado de respuesta de un paciente a los mismos, para el tratamiento del cáncer, actuando el fármaco que actúa sobre el dímero sobre los complejos del receptor Her, tal y como se ha descrito anteriormente.

55 En otro aspecto, la divulgación incluye determinaciones mejoradas de un estado patológico midiendo la expresión de complejos del receptor Her1-Her3 en una muestra de un paciente, así como la expresión de complejos del receptor Her1-Her2 y Her2-Her3.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar un estado de cáncer en un paciente, determinando las cantidades de uno o más dímeros de receptores de la membrana de la superficie celular ErbB o cantidades relativas de una pluralidad de dímeros de receptores de la membrana de la superficie celular en una muestra de tejido o células de dicho paciente. Estos dímeros se miden utilizando al menos dos reactivos, denominados en el presente pares de reactivos, que son específicos para diferentes miembros de cada dímero: un reactivo, denominado en el presente sonda de clivaje, tiene una fracción inductora del clivaje que puede ser inducida para clivar enlaces susceptibles dentro de su proximidad inmediata; y el otro reactivo, denominado en el presente compuesto de unión, tiene una o más etiquetas moleculares unidas mediante enlaces que pueden ser clivados por la fracción inductora del clivaje. De acuerdo con la realización, siempre que estos diferentes miembros forman un dímero, los enlaces clivables son llevados a la proximidad de clivaje efectiva de la fracción inductora del clivaje, de forma que las etiquetas moleculares son liberadas. Las etiquetas moleculares liberadas son entonces separadas de la mezcla de reacción y cuantificadas para proporcionar una medida de la formación de dímeros.

En otro aspecto de la divulgación, los dímeros del receptor ErbB en una muestra del paciente se miden radiométricamente; es decir, la cantidad de un dímero de ErbB se proporciona como un ratio de una medida de un componente presente en el dímero para medir la cantidad total del otro componente del dímero, tanto si está presente en el dímero o en forma monomérica. En una realización, las medidas típicas incluyen la altura del pico o la superficie del pico de los picos en un electroferograma que están correlacionados con etiquetas moleculares concretas.

En una realización concreta de este aspecto, la invención proporciona un método para determinar un estado de cáncer en un paciente, determinando de forma simultánea las cantidades de una pluralidad de dímeros del receptor Her en una muestra de tejido fijado del paciente. Estos dímeros se pueden medir utilizando al menos dos reactivos que son específicos para diferentes miembros de cada dímero: un reactivo, denominado en el presente sonda de clivaje, tiene una fracción inductora del clivaje que puede ser inducida para clivar enlaces susceptibles dentro de su proximidad inmediata; y el otro reactivo, denominado en el presente compuesto de unión, tiene una o más etiquetas moleculares unidas mediante enlaces que pueden ser clivados por la fracción inductora del clivaje. De acuerdo con la realización, siempre que se forman dímeros del receptor Her, los enlaces clivables de los compuestos de unión son llevados a la proximidad de clivaje efectiva de la fracción inductora del clivaje, de forma que las etiquetas moleculares son liberadas. Las etiquetas moleculares son entonces separadas de la mezcla de reacción y cuantificadas para proporcionar una medida de las poblaciones de dímeros del receptor Her. En otra realización de este aspecto, las cantidades relativas de una pluralidad de dímeros del receptor Her se miden y relacionan con un estado de cáncer en un paciente. Algunos ejemplos de cáncer incluyen, a título meramente enunciativo, el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el cáncer de próstata. Algunos ejemplos de dímeros del receptor Her de la divulgación incluyen, a título meramente enunciativo, dímeros del receptor Her1-Her2, dímeros del receptor Her1-Her3, dímeros del receptor Her2-Her3, y dímeros del receptor Her2-Her4, como los enumerados anteriormente.

La presente divulgación proporciona biomarcadores que comprenden medidas de las cantidades de complejos del receptor ErbB en muestras de pacientes. En particular, los perfiles de las poblaciones de complejos del receptor ErbB pueden ser correlacionados con el estado patológico de un paciente y, en algunas realizaciones, con el pronóstico, la eficacia de los fármacos que actúan contra los dímeros de ErbB y la probabilidad de respuesta del paciente a la terapia. De acuerdo con la invención, las carencias existentes en el campo se superan permitiendo la medición directa de los complejos del receptor ErbB en muestras de pacientes, sin necesidad de cultivar o procesar de otro modo las muestras de tejidos o células mediante metodologías, como el xenoinjerto, que incrementan el coste y el trabajo, además de introducir fuentes de ruido y potenciales artefactos en las lecturas finales del ensayo. La presente invención también proporciona una medición secundaria para la fosforilación del receptor intracelular u otras modificaciones que se destruyen fácilmente en los procedimientos de preparación de la muestra. Estas mediciones secundarias se basan en la medición de complejos, como los complejos del receptor con PI3K o SHC, y similares, que dependen de las anteriores modificaciones para su formación y que se ven menos afectados por los procedimientos de preparación de la muestra.

Breve descripción de las ilustraciones

Las Figuras 1A-1F ilustran mediante diagramas el uso de etiquetas moleculares liberables para medir las poblaciones de dímeros del receptor.

Las Figuras 1G-1H ilustran mediante diagramas el uso de etiquetas moleculares liberables para medir los complejos del receptor de superficie celular en muestras de tejido fijado.

Las Figuras 2A-2E ilustran mediante diagramas una realización del método de la invención para elaborar el perfil de las cantidades relativas de dímeros de una pluralidad de tipos de receptores.

Las Figuras 3A-3D ilustran mediante diagramas métodos para unir etiquetas moleculares a anticuerpos.

Las Figuras 4A-4E ilustran datos de los ensayos sobre lisados celulares de SKBR-3 y BT-20 para heterodímeros de receptores empleando un método de la invención.

Las Figuras 5A-5C ilustran datos de ensayos para heterodímeros de receptores sobre muestras de tejido de mama tumoral y normal humana, empleando un método de la invención.

- 5 Las Figuras 6A y 6B ilustran datos de ensayos de la invención para detectar homodímeros y fosforilación de Her 1 en lisados de células BT-20.

La Figura 7 muestra datos de ensayos de la invención que muestran poblaciones de homodímeros Her2 sobre líneas de células MCF-7 y SKBR-3.

- 10 Las Figuras 8A-8B muestran datos de ensayos de la invención que detectan heterodímeros de Her1 y Her3 sobre células, en respuesta al incremento de las concentraciones de heregulina (HRG).

Las Figuras 9A y 9B muestran datos sobre los incrementos de las cantidades de heterodímeros Her1-Her3 sobre células 22Rv1 y A549, respectivamente, con el incremento de las concentraciones del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

- 15 Las Figuras 10A-10C muestran datos sobre la expresión de heterodímeros de IGF-1R y diversos receptores Her en muestras congeladas de tejido de mama humana.

Las Figuras 11 A-11D ilustran el diseño del ensayo y resultados experimentales para detectar un complejo de activación del receptor Her3-PI3 quinasa.

Las Figuras 12A-12D ilustran el diseño del ensayo y los resultados experimentales para detectar un complejo del adaptador-receptor Her3/Shc.

- 20 La Fig. 13 muestra datos para una correlación entre la expresión de heterodímeros de Her2-Her3 y complejos de PI3K//Her3 en células tumorales.

Las Fig. 14A-14B muestran mediciones de poblaciones de dímeros de los receptores Her1-Her2 y Her2-Her3 obtenidas de muestras de tejido de mama normal y de muestras de tejido de mama tumoral.

- 25 Las Fig. 15A-15G muestran mediciones de homodímeros de Her1-Her1 y Her2-Her2 y heterodímeros de Her1-Her2 y Her2-Her3 en secciones de perlas fijadas de líneas de células cancerígenas.

Definiciones

- 30 «Anticuerpo» significa una inmunoglobulina que se une específicamente a una organización polar y espacial concreta de otra molécula y, por tanto, se define como complementaria a la misma. El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y se puede preparar mediante técnicas que son bien conocidas en el campo, tales como la inmunización de un huésped y la recogida de suero (policlonal) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, incluyendo estas inmunoglobulinas las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, 35 IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F (ab')₂, Fab', y similares. Por otra parte, los agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos se pueden utilizar, cuando resulte apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión a un polipéptido concreto. Las directrices para la producción y selección de anticuerpos que se emplean en inmunoensayos, incluyendo los ensayos que emplean la etiqueta molecular liberable (como se describe más adelante) se pueden encontrar en textos y manuales de fácil acceso, por ejemplo Harlow y Lane, Anticuerpos: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1988); Howard y Bethell, Basic Methods in Antibody Production and Characterization (CRC Press, 2001); Wild, editor, The Immunoassay Handbook (Stockton Press, Nueva York, 1994), y similares.

- 45 «Composición de unión a anticuerpo» significa una molécula o un complejo de moléculas que comprende uno o más anticuerpos, o fragmentos de los mismos, y que obtiene su especificidad de unión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Las composiciones de unión a anticuerpo incluyen, a títulos meramente enunciativo, (i) pares de anticuerpos en los que un primer anticuerpo se une específicamente a una molécula diana y un segundo anticuerpo se une específicamente a una región constante del primer anticuerpo; un anticuerpo biotinilado que se une específicamente a una molécula diana y a una proteína estreptavidina, derivatizándose esta proteína con fracciones como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores, o similares, a través de una fracción de biotina; (ii) anticuerpos 50 específicos para una molécula diana y conjugados con un polímero, como dextrano, que, a su vez, se derivatiza con fracciones como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores, sea directamente mediante enlaces covalentes o indirectamente mediante uniones de estreptavidina-biotina; (iii) anticuerpos específicos para una molécula diana y

conjugados con una perla, o microperla, u otro soporte de fase sólida, que, a su vez, se derivatiza, directa o indirectamente, con fracciones tales como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores, o polímeros que contienen estos últimos.

5 «Determinante antigénico» o «epítipo» significa un sitio sobre la superficie de una molécula, habitualmente una proteína, a la que se une una única molécula de anticuerpo; por lo general, una proteína presenta varios o múltiples determinantes antigénicos diferentes y reacciona con anticuerpos de numerosas especificidades diferentes. Un determinante antigénico preferible es un sitio de fosforilación de una proteína.

10 «Fracción de unión» significa cualquier molécula a la que las etiquetas moleculares se pueden unir directa o indirectamente y que es capaz de unirse específicamente a un analito. Las fracciones de unión incluyen, a título meramente enunciativo, anticuerpos, composiciones de unión a anticuerpos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas orgánicas que tienen un peso molecular de hasta 1.000 daltons y que se componen de átomos seleccionados del grupo compuesto por hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Preferiblemente, las fracciones de unión son anticuerpos o composiciones de unión a anticuerpos.

15 «Cáncer» y «canceroso» describen o se refieren a la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular desregulado. Algunos ejemplos de cánceres incluyen, a título meramente enunciativo, un carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Algunos ejemplos más concretos de estos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el
20 cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial, el carcinoma de las glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer de próstata, el cáncer vulvar, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático y diversos tipos de cánceres que afectan a la cabeza y al cuello.

25 Para los fines del presente, «complejo» significa una concurrencia o conjunto de moléculas en contacto directo o indirecto entre sí. En un aspecto, «contacto» o, más concretamente, «contacto directo» en relación con un complejo de moléculas, o en relación con la especificidad o con la unión específica, significa dos o más moléculas que están lo suficientemente cerca como para que las interacciones no covalentes atractivas, como las fuerzas de Van der Waal, la unión de hidrógeno, las interacciones iónicas e hidrófobas, y similares, dominen la interacción de las moléculas. En este aspecto, un complejo de moléculas es estable en el sentido de que, en condiciones de ensayo, el
30 complejo es termodinámicamente más favorable que un estado que no forma un conjunto o un complejo de sus moléculas componentes. Para los fines del presente, «complejo» habitualmente se refiere a un conjunto estable de dos o más proteínas y se denomina de forma equivalente «complejo de proteína-proteína». Más típicamente, un «complejo» se refiere a un conjunto estable de dos proteínas.

35 Con respecto a los receptores de la membrana de superficie celular, «dímero» significa un complejo de dos o más proteínas del receptor unido a la membrana que pueden ser iguales o diferentes. Los dímeros de receptores idénticos se denominan «homodímeros» y los dímeros de receptores diferentes se denominan «heterodímeros». Por lo general, los dímeros se componen de dos receptores en contacto entre sí. Los dímeros se pueden crear en una membrana de superficie celular mediante procesos pasivos, como las interacciones de Van der Waal y similares, tal y como se ha descrito anteriormente en la definición de «complejo», o también se pueden crear mediante procesos
40 activos, tales como la dimerización inducida por ligando, los enlaces covalentes, la interacción con componentes intracelulares o similares, por ejemplo Schlessinger, Cell, 103: 211-225 (2000). Para los fines del presente, se entenderá que el término «dímero» se refiere al «dímero del receptor de la membrana de superficie celular», a menos que el contexto dé a entender lo contrario.

45 «Estado patológico» incluye, a título meramente enunciativo, las características siguientes: probabilidad de contraer una enfermedad, presencia o ausencia de una enfermedad, pronóstico de la gravedad de una enfermedad y probabilidad de que un paciente responda al tratamiento con un agente terapéutico concreto que actúa a través de un complejo de receptores. Con respecto al cáncer, el «estado patológico» incluye también la detección de células o tejidos precancerosos o cancerosos, la selección de pacientes que es probable que respondan al tratamiento con un agente terapéutico que actúa a través de uno o más complejos de receptores, como uno o más dímeros de
50 receptores, y los efectos de mejora del tratamiento con estos agentes terapéuticos. En un aspecto, estado patológico, con respecto a los complejos del receptor Her, significa la probabilidad de que un paciente con cáncer responda al tratamiento con un fármaco que actúa sobre el dímero de Her o ErbB. Preferiblemente, este paciente con cáncer es un paciente con cáncer de mama o de ovario y estos fármacos que actúan sobre el dímero de Her incluyen Omnitarg™ (2C4), Herceptin, ZD-1839 (Iressa), y OSI-774 (Tarceva).

55 «Receptor ErbB» o «receptor Her» es un receptor de la proteína de la tirosina quinasa que pertenece a la familia del receptor ErbB y que incluye los receptores EGFR («Her1»), ErbB2 («Her2»), ErbB3 («Her3») y ErbB4 («Her4»). Por lo general, el receptor ErbB comprende un dominio extracelular, que se puede unir a un ligando de ErbB; un dominio transmembrana lipófilo; un dominio de tirosina quinasa intracelular conservado; y un dominio de señalización

- carboxi-terminal que guarda varios residuos de tirosina que pueden ser fosforilados. El receptor ErbB puede ser un receptor ErbB de secuencia nativa o una variante de una secuencia de aminoácidos del mismo. Preferiblemente, el receptor ErbB es un receptor ErbB humano de secuencia nativa. En un aspecto, el receptor ErbB incluye versiones truncadas de los receptores Her, incluyendo, a título meramente enunciativo, EGFRvIII y p95Her2, divulgados en Chu et al, *Biochem. J.*, 324: 855-861 (1997); Xia et al, *Oncogene*, 23: 646-653 (2004); y similares.
- Los términos «ErbB1», «receptor del factor de crecimiento epidérmico» y «EGFR» y «Her1» se emplean de forma intercambiable en el presente y se refieren al EGFR de secuencia nativa divulgado, por ejemplo, en Carpenter et al. *Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), incluyendo variantes del mismo (tales como el EGFR mutante por delección de Humphrey et al. *PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)). ErbB1 se refiere al gen que codifica el producto de la proteína de EGFR. Algunos ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL RB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase, la Patente estadounidense nº 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, tales como 225 quimerizado (C225) y 225 humano reformado (H225) (véase, WO 96/40210, Imclone Systems Inc.).
- «Her2», «ErbB2» y «c-Erb-B2» se utilizan de forma intercambiable. A menos que se indique lo contrario, los términos «ErbB2», «c-Erb-B2» y «Her2» utilizados en el presente se refieren a la proteína humana. El gen ErbB2 humano y la proteína ErbB2 se describen, por ejemplo, en Semba et al., *PNAS (USA)* 82:6497-650 (1985) y Yamamoto et al. *Nature* 319:230-234 (1986) (número de acceso Genbank X03363). Algunos ejemplos de anticuerpos que se unen específicamente a Her2 se divulgan en las Patentes estadounidenses 5.677.171; 5.772.997; Fendly et al, *Cancer Res.*, 50: 1550-1558 (1990); y similares.
- «ErbB3» y «Her3» se refiere al polipéptido del receptor divulgado, por ejemplo, en las Patentes estadounidenses nº 5.183.884 y 5.480.968, así como en Kraus et al. *PNAS (EE.UU.)* 86:9193-9197 (1989), incluyendo variantes de los mismos. Algunos ejemplos de anticuerpos que se unen a Her3 se describen en la Patente estadounidense nº 5.968.511, por ejemplo el anticuerpo 8B8 (ATCC HB 12070).
- Los términos «ErbB4» y «Her4» utilizados en el presente se refieren al polipéptido del receptor divulgado, por ejemplo, en la Solicitud de patente EP nº 599.274; Plowman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); y Plowman et al., *Nature*, 366:473-475 (1993), incluyendo variantes de los mismos, tales como las isoformas de Her4 divulgadas en WO 99/19488.
- «Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1» o «IGF-1R» significa un receptor humano de tirosina quinasa sustancialmente idéntico a los divulgados en Ullrich et al, *EMBO J.*, 5: 2503-2512 (1986) o Steele-Perkins et al, *J. Biol. Chem.*, 263: 11486-11492 (1988).
- «Aislado» en relación con un polipéptido o proteína significa sustancialmente separado de los componentes de su entorno natural. Preferiblemente, una proteína o polipéptido aislado es una composición que se compone de al menos un ochenta por ciento en peso de la proteína o el polipéptido identificado por la secuencia en comparación con los componentes de su entorno natural; más preferiblemente, esta composición se compone al menos de un noventa y cinco por ciento en peso de la proteína o el polipéptido identificado por la secuencia en comparación con los componentes de su entorno natural; y todavía más preferiblemente, dicha composición se compone al menos de un noventa y nueve por ciento en peso de la proteína o el polipéptido identificado por la secuencia en comparación con los componentes de su entorno natural. Más preferiblemente, una proteína o polipéptido aislado es una composición homogénea que se puede resolver como un único punto tras la separación convencional mediante electroforesis con gel bidimensional basándose en el peso molecular y el punto isoeléctrico. Los protocolos para este análisis mediante electroforesis con gel bidimensional convencional son bien conocidos por las personas normalmente cualificadas en el campo, por ejemplo Hames y Rickwood, Editores, *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach* (TRL Press, Oxford, 1981); Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, Nueva York, 1982); Rabilloud, Editor, *Proteome Research: Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods* (Springer-Verlag, Berlín, 2000).
- «Kit» se refiere a cualquier sistema de administración para administrar materiales o reactivos para llevar a cabo un método de la invención. En el contexto de los ensayos de reacción, estos sistemas de administración incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, el transporte o la administración de reactivos de la reacción (por ejemplo, sondas, enzimas, etc. en los recipientes apropiados) y/o materiales complementarios (por ejemplo, soluciones tampón, instrucciones escritas para la realización del ensayo, etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits incluyen uno o más recipientes (por ejemplo, cajas) que contienen los reactivos de la reacción correspondientes y/o materiales complementarios. Estos contenidos se pueden administrar en el recipiente previsto juntos o por separado. Por ejemplo, un primer recipiente puede contener una enzima para su uso en un ensayo, mientras que un segundo recipiente contiene las sondas.
- «Porcentaje idéntico», o un término similar, empleado con respecto a la comparación de una secuencia de referencia con otra secuencia (es decir, una secuencia «candidata»), significa que en una alineación óptima entre las

dos secuencias, la secuencia candidata es idéntica a la secuencia de referencia en una serie de posiciones de subunidades equivalente al porcentaje indicado, siendo las subunidades nucleótidos para las comparaciones de polinucleótidos o aminoácidos para las comparaciones de polipéptidos. Para los fines del presente, una «alineación óptima» de las secuencias que se están comparando es aquella que maximiza las coincidencias entre subunidades y minimiza el número de huecos empleados para construir una alineación. Los porcentajes de las identidades se pueden determinar con aplicaciones de algoritmos disponibles en el mercado, descritos por Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48: 443-453 (1970) ("GAP" programa de Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group, Madison, WI). Otros paquetes de software en el campo para construir alineaciones y calcular el porcentaje de identidad o realizar otras mediciones de la similitud incluyen el programa «BestFit», basado en el algoritmo de Smith y Waterman, Advances in Applied Mathematics, 2: 482-489 (1981) (Wisconsin Sequence Analysis Package, Genetics Computer Group, Madison, WI). En otras palabras, por ejemplo, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 95 por ciento idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia, hasta el cinco por ciento de los residuos de aminoácidos de la secuencia de referencia puede ser sometido a delección o sustituido por otro aminoácido, o un número de aminoácidos de hasta el cinco por ciento de los residuos de aminoácidos totales de la secuencia de referencia puede ser insertado en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino-terminales o carboxi-terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre dichas posiciones terminales, intercaladas bien individualmente entre residuos de la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos de la secuencia de referencia. Se entiende que para hacer comparaciones con secuencias de referencia de la invención, la secuencia candidata puede ser un componente o segmento de un polinucleótido o polipéptido más largo y que estas comparaciones orientadas a computar el porcentaje de identidad se realizarán con respecto al segmento o componente pertinente.

«Proteína fosfatidilinositol 3-quinasa» o , equivalentemente, una «proteína PI3K» significa una proteína intracelular humana del conjunto de proteínas humanas descritas bajo los números de acceso NCBI NP_852664, NP_S52556, y NP_852665, así como las proteínas que tienen secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas a las mismas.

«Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas» o «PDGFR» significa un receptor de proteína tirosina quinasa humano que es sustancialmente idéntico a PDGFR α o PDGFR β , o variantes de los mismos, descritos en Heldin et al, Physiological Reviews, 79: 1283-1316 (1999). En un aspecto, la invención incluye la determinación de estados de cáncer, condiciones precancerosas, condiciones fibróticas o escleróticas, midiendo uno o más dímeros del grupo siguiente: homodímeros de PDGFR α , homodímeros de PDGFR β , y heterodímeros de PDGFR α - PDGFR β . En particular, las condiciones fibróticas incluyen la fibrosis pulmonar o renal y las condiciones escleróticas incluyen la aterosclerosis. Los cánceres incluyen, a título meramente enunciativo, el cáncer de mama, el carcinoma colorrectal, el glioblastoma y el carcinoma de ovario. Se entiende que la referencia al «PDGFR» solamente significa «PDGFR α » o «PDGFR β ».

«Polipéptido» se refiere a una clase de compuestos consistentes en residuos de aminoácidos químicamente unidos mediante enlaces amida con eliminación de agua entre el grupo carboxi de un aminoácido y el grupo amino del otro aminoácido. Un polipéptido es un polímero de residuos de aminoácidos, que puede contener un gran número de estos residuos. Los péptidos son similares a los polipéptidos, salvo que, por lo general, se componen de un número menor de aminoácidos.

En ocasiones los péptidos se denominan oligopéptidos. No existe una distinción precisa entre polipéptidos y péptidos. Por comodidad, en la presente divulgación y en las reivindicaciones, el término «polipéptido» se empleará para referirse en general a los péptidos y polipéptidos. Los residuos de aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos.

«Proteína» se refiere a un polipéptido, habitualmente sintetizado por una célula biológica, plegado en una estructura tridimensional definida. Por lo general, las proteínas tienen de unos 5.000 a unos 5.000.000 o más de peso molecular, más habitualmente de unos 5.000 a unos 1.000.000 de peso molecular, y pueden incluir modificaciones postranslacionales, como acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de una fracción hemo, enlace covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, enlace covalente de un lípido o derivado de lípido, enlace covalente de fosfatidilinositol, enlace cruzado, ciclización, formación de enlace de disulfuro, farnesilación, dimetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje a GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, fosforilación, prenilación, racemización, selenización, sulfonación y ubiquitinación, por ejemplo Wold, F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects, pág. 1-12 in Post-translational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, 1983. Las proteínas incluyen, a título ilustrativo y sin carácter limitador, citoquinas o interleucinas, enzimas como, por ejemplo, quinasas, proteasas, galactosidasas, etc., protaminas, histonas, albúminas, inmunoglobulinas, escleroproteínas, fosfoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, lipoproteínas, nucleoproteínas, glicoproteínas, receptores de células T, proteoglicanos y similares.

«Muestra de referencia» significa una o más muestras de tejido, xenoinjerto o células que son representativas de un estado normal o no patológico con las que se comparan las mediciones realizadas con muestras de pacientes para determinar si un complejo del receptor está presente en exceso o está presente en una cantidad limitada en la muestra del paciente. La naturaleza de la muestra de referencia es una cuestión de selección del diseño para un ensayo concreto y se puede obtener o determinar a partir del tejido normal del propio paciente o de tejidos de una población de individuos sanos. Preferiblemente, los valores relativos a cantidades de complejos del receptor en las muestras de referencia se obtienen en condiciones experimentales esencialmente idénticas a los valores correspondientes de las muestras de los pacientes que se pretenden testar. Las muestras de referencia pueden ser del mismo tipo de tejido que la muestra del paciente o pueden ser de tipos de tejidos diferentes y la población de la que se obtienen las muestras de referencia se puede seleccionar en función de las características que coinciden con las del paciente, tales como la edad, el sexo, la raza, etc. Típicamente, en los ensayos de la invención, las cantidades de complejos del receptor de las muestras del paciente se comparan con los correspondientes valores de muestras de referencia que han sido previamente tabuladas y se proporcionan como rangos medios, valores medios con desviaciones estándar o representaciones similares. «Complejo del receptor» significa un complejo que comprende al menos un receptor de la membrana de superficie celular. Los complejos del receptor pueden incluir un dímero de los receptores de la membrana de superficie celular o una o más proteínas intracelulares, tales como proteínas adaptadoras, que forman enlaces en las diversas vías de señalización. Algunos ejemplos de proteínas intracelulares que pueden formar parte de un complejo del receptor incluyen, a título meramente enunciativo, proteínas PI3K, proteínas Grb2, proteínas Grb7, proteínas Shc, y proteínas Sos, proteínas Src, proteínas Cbl, proteínas PLC y, proteínas Shp2, proteínas GAP, proteínas Nek, proteínas Vav, y proteínas Crk. En un aspecto, los complejos del receptor incluyen proteínas PI3K o Shc.

«Receptor de tirosina quinasa» o «RTK» significa un receptor humano de una proteína que presenta actividad quinasa intracelular y seleccionada de la familia de proteínas RTK descrita en Schlessinger, Cell, 103: 211-225 (2000); y Blume-Jensen y Hunter (citado anteriormente). «Dímero del receptor de tirosina quinasa» significa un complejo en una membrana de superficie celular que comprende dos receptores de proteína tirosina quinasa. En algunos aspectos, un dímero del receptor de tirosina quinasa puede comprender dos receptores unidos covalentemente de proteínas tirosina quinasa. Algunos ejemplos de dímeros de RTK se recogen en la Tabla I. Los dímeros de RTK de particular interés son los dímeros del receptor Her y los dímeros de VEGFR.

«Muestra» o «muestra de tejido» o «muestra del paciente» o «muestra de tejido o células del paciente» significa una recopilación de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido, como una muestra de un tejido u órgano o una biopsia o aspirado fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualquier componente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido cerebroespinal, fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; o células de cualquier punto en la gestación o el desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están naturalmente entremezclados con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, soluciones tampón, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. En un aspecto de la invención, las muestras de tejido o las muestras del paciente están fijadas, particularmente las muestras convencionales embebidas en parafina y fijadas con formalina. Estas muestras se emplean típicamente en un ensayo para complejos del receptor en forma de secciones finas, por ejemplo de 3-10 µm de grosor, de tejido fijado montado en el portaobjetos de un microscopio o una superficie equivalente. Estas muestras también se someten típicamente a un procedimiento de rehidratación convencional y, óptimamente, a un procedimiento de recuperación de antígeno como parte de las mediciones del ensayo o como preliminar a las mismas.

«Perfil de separación» en relación con la separación de etiquetas moleculares significa un diagrama, un gráfico, una curva, un gráfico de barras u otra representación de los datos de intensidad de la señal frente a un parámetro relacionado con las etiquetas moleculares, tales como el tiempo de retención, la masa o similares, que proporciona una lectura o medida del número de etiquetas moleculares de cada tipo producido en un ensayo. Un perfil de separación puede ser un electroferograma, un cromatograma, un electrocromatograma, un espectrograma de masa o una representación gráfica similar de los datos, dependiendo de la técnica de separación empleada. Un «pico» o una «banda» o una «zona» en relación con un perfil de separación significa una región en la que se concentra un compuesto separado. Pueden existir múltiples perfiles de separación para un único ensayo si, por ejemplo, las diferentes etiquetas moleculares tienen diferentes etiquetas fluorescentes con espectros de emisión distintos y los datos se recopilan y registran a múltiples longitudes de onda. En un aspecto, las etiquetas moleculares liberadas se separan por las diferencias en la movilidad electroforética para formar un electroferograma en el que las diferentes etiquetas moleculares corresponden a distintos picos en el electroferograma. Una medida de la distinción o de la ausencia de solapamiento de picos adyacentes en un electroferograma es la «resolución electroforética», que se puede tomar como la distancia entre máximos picos adyacentes dividida por cuatro veces la mayor de las dos desviaciones estándar de los picos. Preferiblemente, los picos adyacentes tienen una resolución de al menos 1,0, más preferiblemente de al menos 1,5 y más preferiblemente de al menos 2,0. En una separación y un sistema de detección determinados, la resolución deseada se puede obtener seleccionando una pluralidad de etiquetas moleculares cuyos miembros presentan movilidades electroforéticas que difieren al menos en una cantidad

resolutoria de un pico, dependiendo esta cantidad de varios factores bien conocidos por las personas cualificadas en el campo, incluyendo el sistema de detección de la señal, la naturaleza de las fracciones fluorescentes, los coeficientes de difusión de las etiquetas, la presencia o ausencia de matrices cribado, la naturaleza del aparato electroforético, por ejemplo la presencia o ausencia de canales, la longitud de los canales de separación y similares. Los electroferogramas pueden ser analizados para asociar características en los datos con la presencia, la ausencia o las cantidades de etiquetas moleculares, empleando programas de análisis como el divulgado en Williams et al, Publicación de patente estadounidense 2003/0170734 A1.

«SHC» (que significa «homología Src 2/relacionada con el colágeno alfa») significa cualquiera de una familia de proteínas adaptadoras (66, 52 y 46 kDalton) en vías de señalización de RTK sustancialmente idénticas a las descritas en Pelicci et al, Cell, 70: 93-104 (1992). En un aspecto, SHC significa las versiones humanas de estas proteínas adaptadoras.

«Vía de señalización» o «vía de transducción de la señal» significa una serie de eventos moleculares que habitualmente comienzan con la interacción del receptor de superficie celular con un ligando extracelular o con la unión de una molécula intracelular con un sitio fosforilado de un receptor de superficie celular que desencadena una serie de interacciones moleculares, donde la serie de interacciones moleculares conduce a la regulación de la expresión genética en el núcleo de una célula. «Vía Ras-MAPK» significa una vía de señalización que incluye la fosforilación de una proteína MAPK posterior a la formación de un complejo Ras-GTP. «Vía PI3K-Akt» significa una vía de señalización que incluye la fosforilación de una proteína Akt por parte de una proteína PI3K.

«Específico» o «especificidad», en relación con la unión de una molécula a otra, como un compuesto de unión, o una sonda, para un complejo o analito diana, significa el reconocimiento, el contacto y la formación de un complejo estable entre la sonda y el objetivo, junto con el reconocimiento, el contacto o la formación de complejo sustancialmente menor de la sonda con otras moléculas. En un aspecto, «específico», en relación con la unión de una primera molécula a una segunda molécula significa que, en la medida en que la primera molécula reconoce y forma un complejo con otras moléculas en una reacción o muestra, forma el mayor número de complejos con la segunda molécula. En un aspecto, este mayor número es al menos el cincuenta por ciento de todos estos complejos formados por la primera molécula. Por lo general, las moléculas implicadas en un evento de unión específico presentan áreas en sus superficies o en cavidades que dan lugar al reconocimiento específico entre las moléculas que se unen entre sí. Algunos ejemplos de unión específica incluyen las interacciones anticuerpo-antígeno, las interacciones enzima-sustrato, la formación de dúplex o triplex entre polinucleótidos y/u oligonucleótidos, interacciones receptor-ligando y similares.

«Espectralmente resoluble» en relación con una pluralidad de etiquetas fluorescentes significa que las bandas de emisión fluorescentes de las etiquetas son suficientemente distintas, es decir suficientemente no solapadas, que las etiquetas moleculares a las que las respectivas etiquetas están unidas se pueden distinguir sobre la base de la señal fluorescente generada por las respectivas etiquetas mediante sistemas de fotodetección estándar, por ejemplo empleando un sistema de filtros de paso de banda y tubos fotomultiplicadores o similares, tal y como se ejemplifica con los sistemas descritos en las Patentes estadounidenses nº 4.230.558; 4.811.218, o similares, o en Wheelless et al, pág. 21-76, en Flow Cytometry: Instrumentation and Data Analysis (Academic Press, Nueva York, 1985).

«Sustancialmente idéntico» en relación con las proteínas o las secuencias de aminoácidos de las proteínas de una familia de proteínas relacionadas que se van a comparar significa bien que una proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un cincuenta por ciento idéntica a la otra proteína o bien que una proteína es una isoforma o variante de unión del mismo gen que la otra proteína. En un aspecto, sustancialmente idéntico significa una proteína, o una secuencia de aminoácidos de la misma, que es al menos un ochenta por ciento idéntica a la otra proteína, o a la secuencia de aminoácidos de la misma.

Descripción detallada de la invención

La divulgación proporciona un método para utilizar los complejos de receptores de superficie celular ErbB como biomarcadores para un estado patológico u otras condiciones fisiológicas en un organismo biológico, particularmente un estado de cáncer en un ser humano. En un aspecto, los complejos del receptor ErbB se miden directamente en muestras del paciente; es decir, las mediciones se realizan sin cultivo, sin formación de xenoinjertos o sin emplear técnicas similares, que implican unos costes y un trabajo incrementados y que podrían introducir artefactos y/o ruido en el proceso de medición. En un aspecto concreto de la invención, las mediciones de uno o más complejos del receptor se realizan directamente sobre lisados de tejido de muestras del paciente congeladas o sobre secciones de muestras fijadas del paciente. En una realización preferible, uno o más complejos del receptor ErbB se miden en secciones de muestras embebidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE).

En otro aspecto, la divulgación proporciona una medición indirecta de la fosforilación del receptor ErbB a través de la medición de complejos que dependen de estas modificaciones postranslacionales para su formación.

En un aspecto, una pluralidad de complejos del receptor ErbB, como los dímeros del receptor, se miden simultáneamente en la misma mezcla de reacción del ensayo. Preferiblemente, estos complejos se miden utilizando compuestos de unión que tienen una o más etiquetas moleculares liberables unidas, de forma que después de unirse a una proteína de un complejo, las etiquetas moleculares pueden ser liberadas y separadas de la reacción, del ensayo o de la mezcla para la detección y/o cuantificación.

En un aspecto, la invención proporciona un método para determinar un estado patológico de un paciente que comprende los pasos siguientes: medición de una cantidad de uno o más dímeros del receptor ErbB en una muestra de un paciente; comparación de esta cantidad con su correspondiente cantidad en una muestra de referencia; y correlación de las diferencias en las cantidades de la muestra del paciente con las correspondientes cantidades de la muestra de referencia para determinar la presencia o gravedad de una condición patológica del paciente. En una realización preferible, el paso de medición comprende los pasos siguientes: (i) proporcionar uno o más compuestos de unión específicos para una proteína de uno o más dímeros del receptor, de forma que cada compuesto de unión tiene una o más etiquetas moleculares unidas mediante un enlace clivable y que cada etiqueta o etiquetas moleculares unidas a diferentes compuestos de unión tienen diferentes características de separación, de modo que tras la separación las etiquetas moleculares de los diferentes compuestos de unión forman distintos picos en un perfil de separación; (ii) combinación de los compuestos de unión y el complejo o complejos, de forma que los compuestos de unión se unen específicamente a sus respectivos dímeros del receptor para formar complejos detectables; (iii) clivaje del enlace clivable de cada compuesto de unión formando complejos detectables, y (iv) separación e identificación de las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de uno o más dímeros del receptor.

En otro aspecto, el paso de medición de las cantidades de uno o más tipos de dímeros del receptor ErbB comprende los pasos siguientes: (i) proporcionar para cada tipo o tipos de dímeros del receptor una sonda de clivaje específica para un primer receptor en cada dímero o dímeros del receptor, teniendo cada sonda de clivaje una fracción inductora del clivaje con una proximidad efectiva; (ii) proporcionar uno o más compuestos de unión específicos para un segundo receptor de cada dímero o dímeros del receptor, de forma que cada compuesto de unión tiene una o más etiquetas moleculares unidas a través de un enlace clivable y que la etiqueta o etiquetas moleculares unidas a los diferentes compuestos de unión presentan diferentes características de separación, de modo que tras la separación las etiquetas moleculares de los diferentes compuestos de unión forman picos distintos en un perfil de separación; (iii) combinación de las sondas de clivaje, los compuestos de unión y el tipo o tipos de dímeros del receptor, de forma que las sondas de clivaje se unen específicamente a los segundos receptores de los dímeros del receptor y que los enlaces clivables de los compuestos de unión se encuentran dentro de la proximidad efectiva de las fracciones inductoras del clivaje de las sondas de clivaje, para que las etiquetas moleculares sean liberadas; y (iv) separación e identificación de las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de uno o más tipos de dímeros del receptor. Preferiblemente, los dímeros del receptor y los receptores primero y segundo se seleccionan de los dímeros del receptor recogidos en la Tabla I.

En otro aspecto de la divulgación, una muestra biológica, que comprende una población heterogénea de células sospechosas de contener la célula rara de interés es obtenida de un paciente. A continuación se prepara una muestra mezclando la muestra biológica con partículas magnéticas que se unen a un ligando bioespecífico específicamente reactivo con un antígeno sobre la célula rara que es diferente o no se encuentra en las células sanguíneas (denominado en el presente «antígeno de captura»), de forma que se pueden retirar sustancialmente otros componentes de la muestra. La muestra se somete a un campo magnético que es efectivo para separar las células etiquetadas con partículas magnéticas, incluyendo las células raras de interés, si hay alguna presente en la muestra. La población de células aislada de este modo es posteriormente analizada, empleando etiquetas moleculares conjugadas con fracciones de unión específicas para los biomarcadores, a fin de determinar la presencia y/o el número de células raras. En una realización preferible, las partículas magnéticas empleadas en este método son nanopartículas magnéticas coloidales. Preferiblemente, estas poblaciones de células raras son células epiteliales en circulación, que pueden ser aisladas de la sangre de un paciente empleando antígenos de captura específicos de epiteliales, por ejemplo como los divulgados en Hayes et al, *International J. of Oncology*, 21: 1111-1117 (2002); Soria et al, *Clinical Cancer Research*, 5: 971-975 (1999); Ady et al, *British J. Cancer*, 90: 443-448 (2004); que se incorporan al presente como referencia. En particular, el anticuerpo monoclonal BerEP4 (Dynal A.S., Oslo, Noruega) puede emplearse para capturar células epiteliales humanas con partículas magnéticas.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para determinar un estado de cáncer de un paciente que comprende los pasos siguientes: (i) aislamiento inmunomagnéticamente de la muestra de un paciente que comprende células epiteliales en circulación, poniendo en contacto una muestra de sangre de un paciente con una o más composiciones de anticuerpos, siendo cada composición de anticuerpos específica para un antígeno de captura y estando unida a una partícula magnética; (ii) medición de una cantidad de uno o más complejos del receptor ErbB en la muestra del paciente; comparación de cada una de estas cantidades con su correspondiente cantidad en una muestra de referencia; y correlación de las diferencias en las cantidades de la muestra del paciente y las respectivas cantidades correspondientes en la muestra de referencia para determinar la presencia o gravedad de una condición de cáncer en el paciente. En una realización preferible, el paso de medición comprende los pasos siguientes: (i)

5 proporcionar uno o más compuestos de unión específicos para una proteína de uno o más complejos del receptor ErbB, de forma que cada compuesto de unión tiene una o más etiquetas moleculares unidas mediante un enlace clivable y que cada etiqueta o etiquetas moleculares unidas a diferentes compuestos de unión tienen diferentes características de separación, de modo que tras la separación las etiquetas moleculares de los diferentes compuestos de unión forman distintos picos en un perfil de separación; (ii) combinación de los compuestos de unión y el complejo o complejos del receptor ErbB, de forma que los compuestos de unión se unen específicamente a sus respectivas proteínas del complejo o los complejos del receptor ErbB para formar complejos detectables; (iii) clivaje del enlace clivable de cada compuesto de unión formando complejos detectables, y (iv) separación e identificación de las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de uno o más complejos del receptor ErbB.

10 En otro aspecto, el paso de medición de las cantidades de uno o más complejos del receptor ErbB comprende los pasos siguientes: (i) proporcionar para cada complejo o complejos del receptor ErbB una sonda de clivaje específica para una primera proteína en cada complejo o complejos del receptor ErbB, teniendo cada sonda de clivaje una fracción inductora del clivaje con una proximidad efectiva; (ii) proporcionar uno o más compuestos de unión específicos para una segunda proteína de cada complejo o complejos del receptor ErbB, de forma que cada compuesto de unión tiene una o más etiquetas moleculares unidas a través de un enlace clivable y que la etiqueta o etiquetas moleculares unidas a los diferentes compuestos de unión presentan diferentes características de separación, de modo que tras la separación las etiquetas moleculares de los diferentes compuestos de unión forman picos distintos en un perfil de separación; (iii) combinación de las sondas de clivaje, los compuestos de unión y el complejo o complejos, de forma que las sondas de clivaje se unen específicamente a las primeras proteínas de los complejos del receptor ErbB y que los compuestos de unión se unen específicamente a las segundas proteínas de los complejos del receptor ErbB y los enlaces clivables de los compuestos de unión se encuentran dentro de la proximidad efectiva de las fracciones inductoras del clivaje de las sondas de clivaje, para que las etiquetas moleculares sean liberadas; y (iv) separación e identificación de las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia o la cantidad de uno o más complejos del receptor ErbB.

Ejemplos de biomarcadores de dímeros del receptor y fármacos que actúan sobre los dímeros

Los biomarcadores de la divulgación incluyen dímeros y oligómeros de los receptores siguientes.

Tabla 1

Ejemplos de complejos de receptores de las membranas de superficie celular

Dímero	Dímero
Her1-Her1	Heterodímero IGF-1R-Her1
Her1-Her2	Heterodímero IGF-1R-Her3
Her1-Her3	Heterodímeros Her1-PDGFR
Her1-Her4	Heterodímeros Her3-PDGFR
Her2-Her2	Her2-PI3K
Her2-Her3	Her1-SHC
Her2-Her4	Her3-SHC
Her3-Her4	Her2-SHC
Her4-Her4	Her3-PI3K
Heterodímeros Her2-PDGFR	Her1-PI3K
Heterodímero IGF-1R-Her2	

35 Los mecanismos de acción de muchos fármacos que se emplean o que se encuentran en fase de desarrollo exigen la inhibición de una o más funciones de los dímeros del receptor ErbB, tales como la asociación de receptores de los componentes en una estructura de dímero, o una función, como la actividad enzimática, por ejemplo la actividad quinasa o la autofosforilación, que depende de la dimerización. Estos fármacos se denominan en el presente «fármacos que actúan sobre dímeros» o «fármacos que actúan sobre los dímeros de ErbB». El número, tipo,

5 formación y/o disociación de los dímeros del receptor en las células de un paciente que está siendo tratado, o cuyo tratamiento se contempla, influyen en la efectividad o idoneidad del uso de un determinado fármaco que actúa sobre el dímero de ErbB. Los siguientes dímeros del receptor ErbB son biomarcadores relacionados con los fármacos indicados. En un aspecto, la invención proporciona biomarcadores para controlar el efecto sobre el estado patológico de un fármaco que actúa sobre el dímero de ErbB.

Tabla II

Fármacos asociados con dímeros de las membranas de superficie celular

Her1-Her1, Her1-Her2, Her1-Her3, Her1-Her4, Her1-IGF-IR, Her2-IGF-1R	Cetuximab (Erbix), Trastuzumab (Herceptin), h-R3 (TheraCIM), ABX-EGF, MDX-447, ZD-1839 (Iressa), OSI-774 (Tarceva), PKI 166, GW572016, CI-1033, EKB-569, EMD 72000
Her2-Her1, Her2-Her3, Her2-Her2, Her2-Her4	4D4 Mab, Trastuzumab (Herceptin), 2C4, GW572016

10 Las siguientes referencias describen los fármacos que actúan sobre dímeros recogidos en la Tabla II: Traxler, Expert Opin. Ther. Targets, 7: 215-234 (2002); Baselga, editor, Oncology Biotherapeutics, 2: 1-36 (2002); Nam et al, Current Drug Targets, 4: 159-179 (2003); Seymour, Current Drug Targets, 2: 117-133 (2001); y similares.

Tabla III

Complejos del receptor asociados con PI3K

Dímero	Dímero
Her1-Her1	Heterodímero IGF-IR-Her1
Her1-Her2	Her4-Her4
Her1-Her3	Her3-Her4
Her1-Her4	Her2-Her4
Her2-Her2	Her2-Her3
Heterodímero IGF-1R-Her2	Heterodímero IGF-1R-Her3
Heterodímeros Her3-PDGFR	Heterodímeros Her1-PDGFR
Heterodímeros Her2-PDGFR	Her2-XX-PI3K*

* «XX» se refiere a cualquier receptor Her2 con el que es capaz de formar un dímero.

15 **Preparación de muestras**

Las muestras que contienen complejos moleculares pueden proceder de una amplia variedad de fuentes para su uso con la presente invención, a fin de relacionar las poblaciones de complejos de receptores con el estado patológico o el estado saludable, incluyendo cultivos celulares, tejidos de animales o plantas, biopsias de pacientes o similares. Preferiblemente, las muestras son muestras de pacientes humanos. Las muestras se preparan para ensayos de la invención empleando técnicas convencionales, que pueden depender de la fuente de la que se obtiene una muestra.

20 A. Muestras de tejido sólido. Para las biopsias y muestras médicas, se proporciona orientación en las referencias siguientes: Bancroft JD & Stevens A, eds. Theory and Practice of Histological Techniques (Churchill Livingstone, Edinburgo, 1977); Pearse, Histochemistry. Theory and applied. 4ª ed. (Churchill Livingstone, Edimburgo, 1980).

25 En el ámbito del estado patológico canceroso, algunos ejemplos de muestras de tejido de pacientes que se pueden emplear incluyen, a título meramente enunciativo, de mama, próstata, ovario, colon, pulmón, endometrio, estómago, glándula salival o páncreas. La muestra de tejido se puede obtener mediante diversos procedimientos, entre los que se incluyen, a título meramente enunciativo, la escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, se realizan ensayos de la invención sobre muestras de tejido que han sido fijadas y

embebidas en parafina o similares; por tanto, en estas realizaciones se realiza un paso de desparafinación. Una muestra de tejido puede ser fijada (es decir, conservada) mediante una metodología convencional [véase, por ejemplo, «Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology», 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C. Una persona cualificada en el campo apreciará que la elección de un fijador viene determinada por el propósito para el que el tejido vaya a ser histológicamente teñido o analizado de otro modo. Una persona cualificada en el campo también apreciará que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijador empleado. A modo de ejemplo, la solución tampón de formalina neutra, Bouin o paraformaldehído, puede emplearse para fijar una muestra de tejido.

Por lo general, una muestra de tejido se fija primero y posteriormente es deshidratada a través de una serie ascendente de alcoholes, infiltrada y embebida en parafina u otro medio de seccionamiento, para que la muestra de tejido pueda ser seccionada. Alternativamente, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido se puede embeber y procesar en parafina mediante una metodología convencional (véase, por ejemplo, «Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology», más arriba). Algunos ejemplos de parafina que se puede emplear incluyen, a título meramente enunciativo, Paraplast, Broiloid y Tissuemay. Una vez que la muestra de tejido está embebida, la muestra se puede seccionar con un micrótopo o similares (véase, por ejemplo, «Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology», más arriba). A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden tener un grosor en un rango de unos tres micrones hasta unos 12 micrones y, preferiblemente, un grosor en un rango de unos cinco micrones a unos 10 micrones. En un aspecto, una sección puede tener una superficie de unos 10 mm² a 1 cm² aproximadamente. Una vez cortadas, las secciones se pueden unir a portaobjetos mediante diversos métodos estándar. Los ejemplos de adhesivos para portaobjetos incluyen, a título meramente enunciativo, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones embebidas en parafina se pueden unir a portaobjetos de carga positiva y/o portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina.

Si se ha empleado parafina como material para el embebido, las secciones de tejido son generalmente desparafinizadas y rehidratadas con agua. Las secciones de tejido pueden ser desparafinizadas mediante diversas metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, se pueden emplear xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase, por ejemplo, «Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology», más arriba). Alternativamente, se pueden emplear agentes de desparafinado no orgánicos disponibles en el mercado, tales como Hemo-De® (CMS, Houston, Tex.).

Para las células de cultivos de tejidos, tejidos frescos o fuentes similares de mamíferos, se pueden preparar muestras mediante técnicas de lisis celular convencionales (por ejemplo, 0.14 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-Cl (pH 8.6), 0,5% Nonidet P-40, e inhibidores de proteasa y/o fosfatasa, cuando sea necesario). Para los tejidos de mamífero frescos, la preparación de la muestra también puede incluir un paso de desagregación del tejido, como aplastamiento, picado, trituración, sonicación o similares.

B. Aislamiento magnético de las células. En algunas aplicaciones, como la medición de dímeros sobre células metastásicas raras de la sangre de un paciente, se puede realizar un paso de enriquecimiento antes de llevar a cabo un ensayo para detectar las poblaciones de dímeros del receptor de superficie. El enriquecimiento o aislamiento inmunomagnético se puede realizar empleando diversas técnicas y materiales conocidos en el campo, divulgados en las siguientes referencias representativas que se incorporan al presente como referencias: Terstappen et al, Patente estadounidense 6.365.362; Terstappen et al, Patente estadounidense 5.646.001; Rohr et al, Patente estadounidense 5.998.224; Kausch et al, Patente estadounidense 5.665.582; Kresse et al, Patente estadounidense 6.048.515; Kausch et al, Patente estadounidense 5.508.164; Miltenyi et al, Patente estadounidense 5.691.208; Molday, Patente estadounidense 4.452.773; Kronick, Patente estadounidense 4.375.407; Radbruch et al, capítulo 23, en *Methods in Cell Biology*, Vol. 42 (Academic Press, Nueva York, 1994); Uhlen et al, *Advances in Biomagnetic Separation* (Eaton Publishing, Natick, 1994); Safarik et al, *J. Chromatography B*, 722: 33-53 (1999); Miltenyi et al, *Cytometry*, 11: 231-238 (1990); Nakamura et al, *Biotechnol. Prog.*, 17: 1145-1155 (2001); Moreno et al, *Urology*, 58: 386-392 (2001); Racila et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 4589-4594 (1998); Zigeuner et al, *J. Urology*, 169: 701-705 (2003); Ghossein et al, *Seminars in Surgical Oncology*, 20: 304-311 (2001).

Las partículas magnéticas preferibles para el uso en la realización de la presente invención son partículas que se comportan como coloides. Estas partículas se caracterizan por su tamaño de partícula submicrónico, que es generalmente inferior a unos 200 nanómetros (nm) (0,20 micrones) y su estabilidad para la separación gravitacional de la solución durante periodos de tiempo prolongados. Además de muchas otras ventajas, este rango de tamaño hace que sean básicamente invisibles para técnicas analíticas habitualmente empleadas para el análisis celular. Las partículas dentro de un rango de 90-150 nm y que tienen entre un 70-90% de masa magnética se contemplan para el uso en la presente invención. Las partículas magnéticas adecuadas se componen de un núcleo cristalino de un material superparamagnético rodeado de moléculas que están unidas, por ejemplo físicamente absorbidas o covalentemente enlazadas, al núcleo magnético y que confieren propiedades coloidales estabilizantes. El material

de revestimiento se debería aplicar preferiblemente en una cantidad efectiva para evitar interacciones no específicas entre las macromoléculas biológicas que se encuentran en la muestra y los núcleos magnéticos. Estas macromoléculas biológicas pueden incluir residuos de ácido siálico en la superficie de células, lectinas, glicoproteínas y otros componentes no diana de la membrana. Por otra parte, el material debería contener tanta masa/nanopartículas magnéticas como resulte posible. El tamaño de los cristales magnéticos que comprenden el núcleo es suficientemente pequeño como para que no contengan un dominio magnético completo. El tamaño de las nanopartículas es lo suficientemente pequeño como para que su movimiento de Brownian supere su momento magnético. Como consecuencia, la alineación del polo norte, el polo sur y la posterior atracción/repulsión mutua de estas partículas magnéticas coloidales no parece ocurrir ni siquiera en campos magnéticos moderadamente fuertes, lo que contribuye a la estabilidad de su solución. Finalmente, las partículas magnéticas deberían ser separables en separadores de campo externo con un elevado gradiente magnético. Esa característica facilita la manipulación de las muestras y proporciona ventajas económicas con respecto a las columnas de gradiente interno más complicadas cargadas con perlas ferromagnéticas o lana de acero. Las partículas magnéticas que tienen las propiedades anteriormente descritas se pueden preparar mediante la modificación de materiales de base descritos en las Patentes estadounidenses nº 4.795.698, 5.597.531 y 5.698.271, que se incorporan al presente como referencia.

Ensayos empleando etiquetas moleculares liberables

La medición de poblaciones de dímeros empleando etiquetas moleculares liberables ofrece numerosas ventajas, entre las que se incluyen (1) la separación de etiquetas moleculares liberadas de una mezcla de ensayo proporciona un ruido de fondo notablemente reducido y un aumento significativo de la sensibilidad; y (2) el uso de etiquetas moleculares especialmente diseñadas para facilitar la separación y detección ofrece una práctica capacidad de multiplexación, de forma que múltiples componentes del complejo del receptor se puedan medir fácilmente de forma simultánea en el mismo ensayo. Los ensayos que emplean estas etiquetas pueden adquirir diversas formas y se divulgan en las siguientes referencias: Singh et al, Patente estadounidense 6.627.400; Publicaciones de patentes estadounidenses Singh et al, 2002/0013126; y 2003/0170915, y Williams et al, 2002/0146726; y Chan-Hui et al, Publicación de patente internacional WO 2004/011900, quedando todas ellas incorporadas al presente como referencia. Por ejemplo, se puede emplear una amplia variedad de técnicas de separación que pueden distinguir las moléculas basándose en una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se están separando, incluyendo, a título meramente enunciativo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, ratio carga/masa, polaridad o similares. En un aspecto, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto difieren en las características de movilidad electroforética y detección óptica, y son separadas por electroforesis. En otro aspecto, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto pueden diferir en el peso molecular, la forma, la solubilidad, el pKa, la hidrofobicidad, la carga, la polaridad, y son separadas mediante HPLC de fase inversa o de fase normal, HPLC de intercambio de iones, electrocromatografía de capilaridad, espectroscopia de masa, cromatografía en fase gaseosa o una técnica similar.

Se proporcionan conjuntos de etiquetas moleculares que son separadas en distintas bandas o picos mediante una técnica de separación después de que hayan sido liberadas de los compuestos de unión. La identificación y cuantificación de estos picos proporciona una medida o perfil de los tipos y cantidades de dímeros del receptor. Las etiquetas moleculares dentro de un conjunto pueden ser químicamente diversas; sin embargo, habitualmente y por razones de conveniencia, los conjuntos de etiquetas moleculares están químicamente relacionados. Por ejemplo, pueden ser todos péptidos, o pueden estar compuestos de diferentes combinaciones de los mismos elementos básicos o monómeros, o pueden estar sintetizados utilizando el mismo soporte básico con diferentes grupos sustitutivos para impartir diferentes características de separación, como se describe más detalladamente a continuación. El número de etiquetas moleculares en una pluralidad puede variar dependiendo de varios factores, entre los que se incluyen, el modo de separación empleado, las marcas usadas en las etiquetas moleculares para la detección, la sensibilidad de las fracciones de unión, la eficiencia con la que se clivan los enlaces clivables, etc. En un aspecto, el número de etiquetas moleculares en una pluralidad para medir poblaciones de dímeros del receptor se encuentra en un rango de 2 a 10. En otros aspectos, el tamaño de la pluralidad puede encontrarse en un rango de 2 a 8, 2 a 6, 2 a 4, o 2 a 3.

Los dímeros del receptor se pueden detectar en ensayos que tienen formatos homogéneos o no homogéneos, es decir formatos heterogéneos. En un formato homogéneo, no se precisa ningún paso para separar compuestos de unión específicamente unidos a complejos diana de los compuestos de unión no unidos. En una realización preferible, los formatos homogéneos emplean pares de reactivos que comprenden (i) uno o más compuestos de unión con etiquetas moleculares liberables y (ii) al menos una sonda de clivaje que es capaz de generar una especie activa que reacciona con etiquetas moleculares y las libera dentro de una proximidad efectiva de la sonda de clivaje.

Los dímeros del receptor también se pueden detectar mediante ensayos que emplean un formato heterogéneo. Normalmente las técnicas heterogéneas implican un paso de separación, donde los complejos intracelulares que tienen compuestos de unión específicamente unidos son separados de los compuestos de unión no unidos y, opcionalmente, otros componentes de la muestra, tales como proteínas, fragmentos de la membrana y similares. La separación se puede conseguir de diversas maneras, como empleando un reactivo unido a un soporte sólido que

distingue entre los compuestos de unión unidos al complejo y no unidos. El soporte sólido puede ser la pared de un recipiente, por ejemplo el pocillo de una placa de microtitulación, un capilar, una placa, un portaobjetos, perlas, incluyendo perlas magnéticas, liposomas o similares. Las características principales del soporte sólido son que (1) permite la segregación de los compuestos de unión unidos y no unidos, y (2) no interfiere en la formación del complejo de unión ni en las otras operaciones para la determinación de los dímeros del receptor. Habitualmente, en muestras fijadas, los compuestos de unión no unidos se eliminan simplemente mediante lavado.

Con la detección empleando etiquetas moleculares en un formato heterogéneo, después del lavado, se puede combinar una muestra con un solvente en el que se van a liberar las etiquetas moleculares. Dependiendo de la naturaleza del enlace clivable y del método de clivaje, el solvente puede incluir cualquier reactivo adicional para el clivaje. Cuando no sean necesarios reactivos para el clivaje, el solvente convenientemente puede ser una solución tampón de separación, por ejemplo un medio de separación electroforético. Por ejemplo, cuando el enlace clivaje es fotolábil o clivable a través de una especie activa generada por un fotosensibilizador, se puede irradiar luz de la longitud de banda apropiada sobre el medio para liberar las etiquetas moleculares en la solución tampón.

En cualquiera de los formatos, si las condiciones de la reacción de ensayo interfieren en la técnica de separación empleada, puede resultar necesario retirar o cambiar la solución tampón de la reacción de ensayo antes del clivaje y la separación de las etiquetas moleculares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las condiciones de ensayo incluyen concentraciones de sal (por ejemplo, necesarias para la unión específica) que degradan el rendimiento de la separación cuando las etiquetas moleculares se separan sobre la base de la movilidad electroforética. En estas realizaciones, una solución tampón de ensayo es sustituida por un medio o una solución tampón de separación, antes de la liberación y separación de las etiquetas moleculares.

Los ensayos que emplean etiquetas moleculares liberables y sondas de clivaje se pueden realizar en múltiples configuraciones y formatos diferentes, dependiendo de los complejos que se detectan o miden. Basándose en la presente divulgación, una persona cualificada en el campo elegirá el diseño oportuno para seleccionar las cantidades y especificidades de sondas de clivaje y compuestos de unión concretos.

En un aspecto de la invención, el uso de etiquetas moleculares liberables para medir dímeros de las membranas de superficie celular se muestra en forma de diagrama en las Fig. 1A y 1B. Los compuestos de unión (100) que tienen etiquetas moleculares «mT₁» y «mT₂» y sonda de clivaje (102) con un fotosensibilizador «PS» se combinan con células biológicas (104). Los compuestos de unión que tienen la etiqueta molecular «mT₁» son específicos para los receptores de superficie celular R₁ (106) y los compuestos de unión que tienen la etiqueta molecular «mT₂» son específicos para los receptores de superficie celular R₂ (108). Los receptores de superficie celular R₁ y R₂ están presentes como monómeros, por ejemplo (106) y (108), y como dímeros (110) en la membrana de superficie celular (112). Después estos componentes del ensayo son incubados en una solución tampón de unión adecuada para permitir la formación (114) de complejos estables entre los compuestos de unión y sus respectivos receptores diana y entre la sonda de clivaje y su receptor diana. Tal y como se ha ilustrado, preferiblemente tanto los compuestos de unión como las sondas de clivaje comprenden una composición de unión a anticuerpo, que permite que las etiquetas moleculares y la fracción inductora del clivaje sean dirigidas específicamente a los componentes de la membrana. En un aspecto, estas composiciones de unión a anticuerpo son anticuerpos monoclonales. En estas realizaciones, las soluciones tampón de unión pueden comprender soluciones tampón empleadas en técnicas de ELISA convencionales o similares. Después de unir los compuestos y las sondas de clivaje para los compuestos estables (116), la mezcla del ensayo es iluminada (118) para inducir a los fotosensibilizadores (120) a generar oxígeno singlete. El oxígeno singlete reacciona rápidamente con los componentes de la mezcla del ensayo, de forma que su proximidad efectiva (122) para clivar los enlaces clivables de las etiquetas moleculares está espacialmente limitada a fin de que solamente las etiquetas moleculares que se encuentran dentro de la proximidad efectiva sean liberadas (124). Tal y como se ha ilustrado, las únicas etiquetas moleculares liberadas son las de los compuestos de unión que forman complejos estables con los dímeros de R₁-R₂ y una sonda de clivaje. Las etiquetas moleculares liberadas (126) se retiran de la mezcla del ensayo y se separan (128) de acuerdo con una característica de separación, para que se forme un pico distinto (130) en un perfil de separación (132). De acuerdo con la invención, esta retirada y separación puede ser un mismo paso. Opcionalmente, antes de la iluminación la solución tampón de unión puede ser retirada y sustituida por una solución tampón más adecuada para la separación, es decir una solución tampón de separación. Por ejemplo, las soluciones tampón de unión típicamente presentan concentraciones de sal que pueden degradar el rendimiento de algunas técnicas de separación, tales como la electroforesis por capilaridad, para separar las etiquetas moleculares en distintos picos. En una realización, este cambio de soluciones tampón se puede realizar mediante una filtración por membrana.

Una realización que ilustra la medición ratiométrica de heterodímeros se ilustra en la Fig. 1C, en la que se emplea un compuesto de unión adicional para dar una medida de la cantidad total de proteína (1104) en una muestra. Los reactivos (1122) de la invención comprenden (i) sondas de clivaje (1108), un primer compuesto de unión (1106) y un segundo compuesto de unión (1107), donde el primer compuesto de unión (1106) es específico para la proteína (1102) y un segundo compuesto de unión (1107) es específico para la proteína (1104) a un determinante antigénico diferente a aquel para el que es específico la sonda de clivaje (1108). Después de la unión de los reactivos, la sonda

de clivaje (1108) es activada para producir especies activas que clivan los enlaces clivables de las etiquetas moleculares dentro de la proximidad efectiva del fotosensibilizador. En esta realización, las etiquetas moleculares son liberadas de los monómeros de la proteína (1104) que tienen ambos reactivos (1107) y (1108) unidos y de los heterodímeros que tienen el reactivo (1108) unido y alguno de los reactivos o ambos (1106) y (1107) unidos. Las etiquetas moleculares liberadas (1123) son separadas y los picos (1118 and 1124) de un perfil de separación (1126) son correlacionados con las cantidades de las etiquetas moleculares liberadas. En esta realización, las alturas relativas de los picos, o las áreas, pueden reflejar (i) las diferencias en la afinidad del primer y el segundo compuesto de unión con sus respectivos determinantes antigénicos, y/o (ii) la presencia o ausencia del determinante antigénico para el que es específico el compuesto de unión. La segunda situación es importante siempre que se emplee un compuesto de unión para controlar el estado postranslacional de una proteína, por ejemplo el estado de fosforilación.

Los homodímeros se pueden medir tal y como se ilustra en la Fig. 1D. Como se ha señalado anteriormente, un ensayo puede comprender tres reactivos (1128): sondas de clivaje (1134), un primer compuesto de unión (1130) y un segundo compuesto de unión (1132). El primer compuesto de unión (1130) y la sonda de clivaje (1134) están estructurados para ser específicos para el mismo determinante antigénico (1135) de la proteína (1138) que existe (1140) en una muestra como homodímero (1136) o como monómero (1138). Una vez que los reactivos (1128) son combinados con una muestra en condiciones que promueven la formación de complejos estables entre los reactivos y sus respectivas dianas, se forman múltiples complejos (1142 a 1150) en la mezcla de ensayo. Dado que la sonda de clivaje (1134) y el compuesto de unión (1130) son específicos para el mismo determinante antigénico (1135), cuatro combinaciones diferentes (1144 a 1150) de reactivos pueden formar complejos con homodímeros. De los complejos de la muestra del ensayo, solamente aquellos (1143) con tanto una sonda de clivaje (1134) como al menos un compuesto de unión aportarán etiquetas moleculares liberadas (1151) para la separación y detección (1154). En esta realización, el tamaño del pico (1153) es proporcional a la cantidad de homodímero en la mezcla del ensayo, mientras que el tamaño del pico (1152) es proporcional a la cantidad total de proteína (1138) en la muestra del ensayo, tanto en forma monomérica (1142) como en forma homodimérica (1146 y 1148). La Fig. 1E ilustra las mediciones análogas para los receptores de superficie celular que forman heterodímeros en la membrana de superficie celular (1161). Una persona cualificada en el campo entendería que los dímeros se pueden medir en lisados de células o tejidos, o bien en muestras fijadas cuyas membranas han sido permeabilizadas o eliminadas a través del proceso de fijación. En estos casos, los compuestos de unión pueden ser específicos para dominios extracelulares o intracelulares de los receptores de la membrana de superficie celular. Tal y como se ilustra en las Fig. 1E y 1F, las etiquetas moleculares liberables también se pueden emplear para la detección simultánea o la medición de múltiples dímeros y complejos intracelulares en una muestra celular. Las células (160), que pueden ser de una muestra de cultivos *in vitro* o de una muestra de tejido del paciente, son lisadas (172) para obtener complejos moleculares accesibles asociados con la membrana de la célula y/o sitios de modificación postranslacionales, tales como sitios de fosforilación, dentro de los dominios citoplásmicos de las moléculas de la membrana. Posteriormente, el lisado resultante (174) se combina con reactivos del ensayo (176) que incluyen múltiples sondas de clivaje (175) y múltiples compuestos de unión (177). Se seleccionan unas condiciones de ensayo (178) que permiten que los reactivos (176) se unan específicamente a sus respectivas diana, de forma que tras la activación los enlaces clivables dentro de la proximidad efectiva (180) de las fracciones inductoras del clivaje son clivados y las etiquetas moleculares liberadas (182). Como se ha señalado anteriormente, después del clivaje, las etiquetas moleculares liberadas son separadas (184) e identificadas en un perfil de separación (186), como un electroferograma, y basándose en el número y las cantidades de etiquetas moleculares medidas, se obtiene un perfil de los complejos moleculares seleccionados en las células de la muestra.

Las Fig. 1G y 1H ilustran una realización de la invención para medir complejos del receptor en muestras de tejido fijado o congelado. La muestra de tejido fijado (1000), por ejemplo una muestra embebida en parafina y fijada con formalina, se corta para proporcionar una sección (1004) empleando un micrótopo o un instrumento similar y después de colocarla sobre una superficie (1006), que puede ser el portaobjetos de un microscopio, se desparafina y se rehidrata para la aplicación de los reactivos del ensayo. La ampliación (1007) muestra la porción (1008) de la sección (1004) sobre la porción (1014) del portaobjetos de un microscopio (1006). Las moléculas del dímero del receptor (1018) se ilustran como embebidas en los residuos de la estructura de la membrana (1016) de la muestra fijada. De acuerdo con este aspecto de la invención, la sonda de clivaje y los componentes de unión son incubados con la muestra fijada para que se unan a sus moléculas diana. Por ejemplo, las sondas de clivaje (1012) (ilustradas en la figura como un anticuerpo que tiene un fotosensibilizador («PS») unido) y un primer compuesto de unión (1010) (ilustrado como un anticuerpo que tiene una etiqueta molecular «mT₁» unida) se unen específicamente al receptor (1011) común a todos los dímeros mostrados, un segundo compuesto de unión (1017) (con «mT₂») se une específicamente al receptor (1015), y un tercer compuesto de unión (1019) (con «mT₃») se une específicamente al receptor (1013). Después de lavar para eliminar los compuestos de unión y la sonda de clivaje que no están específicamente unidos a sus respectivas moléculas diana, se añade la solución tampón (1024) (denominada «solución tampón de iluminación» en la Figura). Por comodidad, la solución tampón (1024) puede ser contenida en la sección (1004) o una porción de la misma, creando una barrera hidrófoba en el portaobjetos (1006), por ejemplo con un rotulador de cera. Tras la iluminación de los fotosensibilizadores y la liberación de las etiquetas moleculares

(1026), la solución tampón (1024) que contiene ahora las etiquetas moleculares liberadas (1025) se transfiere a un dispositivo de separación, como un instrumento de electroforesis por capilaridad, para la separación (1028) e identificación de las etiquetas moleculares liberadas, por ejemplo, en un electroferograma (1030).

5 Las mediciones realizadas directamente sobre muestras de tejido, particularmente como se ilustra en las Fig. 1G y 1H, pueden ser normalizadas incluyendo mediciones sobre dianas celulares o tisulares que son representativas del número de células total de la muestra y/o de las cantidades de determinados subtipos de células en la muestra. Estas dianas tisulares se denominan en el presente «indicadores tisulares». La medición adicional puede ser preferible, o incluso necesaria, debido a la heterogeneidad celular y tisular de las muestras de los pacientes, en particular las muestras tumorales, que pueden comprender fracciones sustanciales de células normales. Por ejemplo, en la Fig. 1H, los valores para la cantidad total del receptor (1011) se pueden proporcionar como un ratio de 10 las dos mediciones siguientes: el área del pico (1032) de la etiqueta molecular («mT₁») y el área de un pico correspondiente a una etiqueta molecular correlacionada con un componente celular o tisular común a todas las células de la muestra, por ejemplo tubulina o similares. En algunos casos, cuando todas las células de la muestra son células epiteliales, se puede emplear citoqueratina. Por consiguiente, los métodos de detección basados en las 15 etiquetas moleculares liberables pueden incluir un paso adicional consistente en proporcionar un compuesto de unión (con una etiqueta molecular distinta) específico para una proteína de normalización, como la tubulina.

Las Figuras 2A-2E ilustran otra realización de la invención para elaborar un perfil de la dimerización entre una pluralidad de tipos de receptores. La Figura 2A explica los pasos básicos de este ensayo. Las membranas celulares (200) que se van a testar para detectar la presencia de dímeros de receptores de superficie celular se combinan con conjuntos de compuestos de unión (202) y (204) y una sonda de clivaje (206). Las fracciones de la membrana (200) 20 contienen tres tipos diferentes de moléculas del receptor de monómeros («1», «2» y «3») en su membrana celular, que se asocian para formar tres heterodímeros diferentes: 1-2, 1-3, y 2-3. Tres reactivos de anticuerpos (202) y (204) se combinan con la fracción de la membrana (200), teniendo cada uno de los reactivos de anticuerpos especificidad para una de las tres moléculas del receptor, donde el anticuerpo (206) es específico para la molécula 1 del receptor, el anticuerpo (204) es específico para la molécula 2 del receptor y el anticuerpo (202) es específico para la molécula 3 del receptor. El anticuerpo para la primera molécula del receptor está covalentemente enlazada con una molécula fotosensibilizadora, etiquetada con PS. Los anticuerpos para la segunda y la tercera molécula del receptor están unidos a dos etiquetas diferentes, etiquetadas con T₂ y T₃, respectivamente, a través de un enlace clivaje mediante una especie activa generada por la fracción fotosensibilizadora.

30 Después de mezclar, se deja que los anticuerpos se unan (208) a las moléculas sobre la superficie de las membranas. El fotosensibilizador es activado (210), clivando el enlace entre las etiquetas y los anticuerpos que se encuentran a una distancia accionable de una molécula sensibilizadora, liberando así etiquetas en el medio de ensayo. El material de la reacción se separa (212) posteriormente, por ejemplo mediante electroforesis por capilaridad, tal y como se ilustra. Como se muestra en la parte inferior de la Figura 2A, las etiquetas T₂ y T₃ son liberadas y la separación mediante electroforesis revelará dos bandas correspondientes a estas etiquetas. Dado que 35 las etiquetas están diseñadas para tener una movilidad electroforética conocida, cada una de las bandas se puede asignar de forma única a una de las etiquetas utilizadas en el ensayo.

Como se muestra en la Fig. 2A, solamente dos de los tres heterodímeros diferentes que están presentes en la membrana celular se unirán tanto a un anticuerpo que contiene fotosensibilizador como a un anticuerpo que contiene etiqueta, por lo que solamente estas dos especies darían lugar a etiquetas liberadas. No obstante, se precisan múltiples experimentos para medir las cantidades relativas de los diferentes dímeros. La Fig. 2B proporciona una tabla que recoge cinco combinaciones de ensayo diferentes. En la Fig. 2C se encuentran los resultados ilustrativos para cada composición del ensayo. El Ensayo I representa los resultados del ensayo completo, tal y como se describe en la Figura 2A. En el Ensayo II, el anticuerpo específico para la molécula 1 del receptor, que está unida al fotosensibilizador, es suprimido. Este ensayo no produce ninguna señal, lo que indica que las señales T₂ y T₃ obtenidas en el Ensayo I necesitan el reactivo fotosensibilizador. Asimismo, el Ensayo V muestra que las señales de la etiqueta necesitan la presencia de las membranas. Los Ensayos III y IV muestran que cada uno de los reactivos etiquetados no necesita la presencia del otro para ser clivado. Estos resultados, cuando se analizan conjuntamente, permiten sacar las conclusiones con respecto a la presencia y a la composición de los heterodímeros del receptor presentes en la membrana, recogidos en la Figura 2C, es decir, que tanto el heterodímero 1-2 como el 1-3 están presentes. Por otra parte, las intensidades de señal relativas de cada etiqueta permiten estimar la abundancia relativa de cada uno de los heterodímeros.

Sin embargo, no se puede sacar una conclusión relativa a la existente del heterodímero 2-3 con la combinación de reactivos empleada en este ensayo. No se obtendrá ninguna señal que represente a este complejo, independientemente de que esté presente o no, porque no tendrá un reactivo fotosensibilizador unido al mismo. Para poder sacar conclusiones sobre cada combinación dimérica posible de los tres monómeros, es necesario utilizar un cuarto reactivo que se pueda localizar en todos los oligómeros posibles que comprendan los monómeros 1, 2 y/o 3, o bien unir los tres agentes de unión empleados en este experimento con las etiquetas y las moléculas sensibilizadoras en diferentes combinaciones. Esta última estrategia se ilustra en las Figuras 2D y 2E. Tres 55

combinaciones posibles de la distribución de las etiquetas y los fotosensibilizadores entre los tres reactivos de los anticuerpos se recogen en la tabla de la izquierda de la Figura 2D. La primera combinación comprende un fotosensibilizador unido al anticuerpo específico para el monómero número 1 y es la misma combinación empleada en la ilustración de la Figura 2A-2C, y tiene la misma población de dímeros que en la Figura 2C. La segunda combinación comprende un fotosensibilizador unido al anticuerpo específico para el monómero número 2 y el perfil de la población produce el mismo número para el heterodímero 1-2, más un valor para el heterodímero 2-3. La tercera combinación comprende un fotosensibilizador unido al anticuerpo específico para el monómero número 3 y el perfil de la población produce el mismo número para el heterodímero 1-3 y 2-3 que el obtenido de las dos primeras combinaciones. Estos resultados se pueden combinar para producir el perfil de la población de heterodímeros total recogido en la Figura 2E.

Una realización preferible para medir las cantidades relativas de dímeros del receptor que contienen un receptor del componente común se ilustra en la Fig. 2F. En el diseño de este ensayo, dos dímeros del receptor diferentes («1-2» (240) y «2-3» (250)), teniendo cada uno un componente común «2», se pueden medir radiométricamente con respecto al componente común. Se muestra un diseño del ensayo para medir el heterodímero del receptor (240) que comprende el receptor «1» (222) y el receptor «2» (220) y el heterodímero del receptor (250) que comprende el receptor «2» (220) y el receptor «3» (224). Una característica principal de esta realización es que la sonda de clivaje (227) se puede hacer específica para el receptor común del par de heterodímeros. El compuesto de unión (228) específico para el receptor «2» proporciona una señal (234) relacionada con la cantidad total del receptor «2» en el ensayo, mientras que el compuesto de unión (226) específico para el receptor «1» y el compuesto de unión (230) específico para el receptor «3» proporcionan señales (232 y 236, respectivamente) relacionadas únicamente con la cantidad del receptor «1» y del receptor «3» presentes como heterodímeros con el receptor «2», respectivamente. El diseño de la Fig. 2F se puede generalizar a más de dos complejos del receptor que contienen un componente común, simplemente añadiendo compuestos de unión específicos para los componentes de los complejos adicionales.

25 A. Compuestos de unión

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden proporcionar mezclas que contienen pluralidades de diferentes compuestos de unión, donde cada compuesto de unión diferente tiene una o más etiquetas moleculares unidas a través de enlaces clivables. La naturaleza del compuesto de unión, del enlace clivable y de la etiqueta molecular puede variar en gran medida. Un compuesto de unión puede comprender una composición de unión a anticuerpo, un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de un oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse específicamente a una molécula o proteína diana o a una formación de complejo estable con un analito de interés, como un complejo de proteínas. En un aspecto, un compuesto de unión, que se puede representar por la fórmula siguiente, comprende una o más etiquetas moleculares unidas a una fracción de unión.



donde B es la fracción de unión; L es un enlace clivable; y E es una etiqueta molecular. En ensayos homogéneos, el enlace clivable L puede ser un enlace lábil a la oxidación y, más preferiblemente, es un enlace que puede ser clivado por oxígeno singlete. La fracción «-(L-E)_k» indica que un único compuesto de unión puede tener múltiples etiquetas moleculares unidas mediante enlaces clivables. En un aspecto, k es un número entero mayor o igual a uno, aunque en otras realizaciones, k puede ser superior a varios cientos, por ejemplo de 100 a 500, o k puede ser de varios cientos a varios miles, por ejemplo de 500 a 5.000. Habitualmente, cada una de las pluralidades de los diferentes tipos de compuestos de unión tienen una etiqueta molecular diferente, E. Los enlaces clivables, por ejemplo enlaces lábiles a la oxidación, y las etiquetas moleculares E se unen a B mediante procesos químicos convencionales.

Preferiblemente, B es una composición de unión a anticuerpo que se une específicamente a una diana, como un determinante antigénico predeterminado de una proteína diana, como un receptor de superficie celular. Estas composiciones se pueden formar fácilmente a partir de una amplia variedad de anticuerpos disponibles en el mercado, tanto monoclonales como policlonales, específicos para las proteínas de interés. En particular, los anticuerpos específicos para los receptores del factor de crecimiento epidérmico se divulgan en las siguientes patentes, que quedan incorporadas al presente como referencia: 5.677.171; 5.772.997; 5.968.511; 5.480.968; 5.811.098. La patente estadounidense 6.488.390, incorporada al presente como referencia, divulga anticuerpos específicos para un receptor unido a la proteína G, CCR4. La patente estadounidense 5.599.681, incorporada al presente como referencia, divulga anticuerpos específicos para sitios de fosforilación de las proteínas. Distribuidores comerciales como Cell Signaling Technology (Beverly, MA), Biosource International (Camarillo, CA), y Upstate (Charlottesville, VA), también proporcionan anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para muchos receptores.

El enlace clivable L puede ser prácticamente cualquier grupo de enlace químico que pueda ser clivado en unas condiciones que no degraden la estructura ni afecten a las características de detección de la etiqueta molecular liberada E. Siempre que se emplea una sonda de clivaje en un formato de ensayo homogéneo, el enlace de clivaje L es clivado mediante un agente de clivaje generado por la sonda de clivaje que actúa a corta distancia, de forma que solamente se realice el clivaje de los enlaces clivables en la proximidad inmediata de la sonda de clivaje. Típicamente este agente debe ser activado realizando una variación física o química en la mezcla de reacción, para que el agente produzca una especie activa efímera que se difunda a un enlace clivable para efectuar el clivaje. En un formato homogéneo, el agente de clivaje se une preferiblemente a una fracción de unión, como un anticuerpo, dirigida antes de la activación del agente de clivaje a un sitio concreto en la proximidad de un compuesto de unión con etiquetas moleculares liberables. En estas realizaciones, el agente de clivaje se denomina en el presente «fracción inductora del clivaje», que se debate a continuación de forma más detallada.

En un formato no homogéneo, dado que los compuestos de unión específicamente unidos son separados de los compuestos de unión no unidos, se puede emplear una selección más amplia de enlaces clivables y agentes de clivaje. Los enlaces clivables no solamente pueden incluir enlaces que son lábiles a la reacción con una especie activa que actúa localmente, como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete y similares, sino también enlaces que son lábiles a los agentes que operan en toda una mezcla de reacción, tales como enlaces lábiles a las bases, enlaces fotoclivables, enlaces clivables por reducción, enlaces clivados por oxidación, enlaces lábiles a los ácidos, enlaces peptídicos clivables por proteasas específicas y similares. Las referencias que describen muchos de estos enlaces incluyen Greene y Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Segunda edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1991); Hermanson, *Bioconjugate Techniques* (Academic Press, Nueva York, 1996); y Still et al, Patente estadounidense 5.565.324.

En un aspecto, se pueden emplear con la invención los sistemas de reactivos clivables disponibles en el mercado. Por ejemplo, se puede introducir un enlace de disulfuro entre una composición de unión a anticuerpo y una etiqueta molecular, empleando un agente heterofuncional como N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT), o similares, ofrecidos por distribuidores comerciales como Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Los enlaces de disulfuro introducidos por estas uniones se pueden romper mediante un tratamiento con un agente reductor, como ditiotreititol (DTT), ditioeritritol (DTE), 2-mercaptoetanol, borohidruro de sodio o similares. Las concentraciones típicas de los agentes reductores para efectuar el clivaje de los enlaces de disulfuro se encuentran en el rango de 10 a 100 mM. Se puede introducir un enlace lábil a la oxidación entre una composición de unión a anticuerpo y una etiqueta molecular, empleando el reactivo de enlace cruzado de un éster de NHS homobifuncional, tartarato de disuccinimidilo (DST) (distribuido por Pierce) que contiene dioles cis susceptibles al clivaje con periodato de sodio (por ejemplo 15 mM de periodato a un pH fisiológico durante cuatro horas). Los enlaces que contienen componentes separadores esterificados pueden ser clivados con agentes nucleofílicos fuertes, como la hidroxilamina, por ejemplo 0,1 N hidroxilamina, pH 8.5, durante 3-6 horas a 37 °C. Estos separadores se pueden introducir mediante un agente de enlace cruzado homobifuncional como el glicol de etileno bis (succinimidilsuccinato) (EGS) comercializado por Pierce (Rockford, IL). Se puede introducir un enlace lábil a las bases con un grupo de sulfona. Entre los agentes de enlace cruzado homobifuncionales que se pueden emplear para introducir grupos de sulfona en un enlace clivable se incluyen bis [2-(succinimidiloxycarboniloxi)etil]sulfona (BSOCOES), y 4,4-difluoro-3,3-dinitrofenilsulfona (DFDNPS). Algunos ejemplos de condiciones básicas para el clivaje incluyen 0,1 M de fosfato de sodio, ajustado a un pH 11.6 mediante la adición de Tris base, que contiene 6 M de urea, 0,1% de SDS, y 2 mM de DTT, con incubación a 37 °C durante dos horas. Los enlaces fotoclivables incluyen aquellos divulgados en Rothschild et al, Patente estadounidense nº 5.986.076.

Cuando L es lábil a la oxidación, L puede ser un trioeter o su análogo de selenio; o una olefina, que contiene enlaces dobles de carbono-carbono, donde el clivaje de un enlace doble con un grupo oxo libera la etiqueta molecular E. Algunos ejemplos de enlaces lábiles a la oxidación se divulgan en Singh et al, Patente estadounidense nº 6.627.400; y en las Publicaciones de patentes estadounidenses Singh et al, 2002/0013126; y 2003/0170915, y en Willner et al, Patente estadounidense nº 5.622.929, quedando todas ellas incorporadas al presente como referencia.

La etiqueta molecular E de la presente invención puede comprender una etiqueta electrónfona, tal como se describe en las referencias siguientes, cuando la separación de las pluralidades de etiquetas moleculares se realiza mediante cromatografía gaseosa o espectrometría de masas: Zhang et al, *Bioconjugate Chem.*, 13: 1002-1012 (2002); Giese, *Anal. Chem.*, 2: 165-168 (19S3); y las Patentes estadounidenses nº 4.650.750; 5.360.819; 5.516.931; 5.602.273; y similares.

La etiqueta molecular E es preferiblemente un compuesto orgánico soluble en agua que es estable con respecto a las especies activas, especialmente el oxígeno singlete, y que incluye un grupo de detección o indicador. Por otra parte, E puede ser muy variable en términos de tamaño y estructura. En un aspecto, E tiene un peso molecular en el rango de unos 50 a unos 2500 daltons, más preferiblemente de unos 50 a unos 1500 daltons. Las estructuras preferibles de E se describen más detalladamente a continuación. E puede comprender un grupo de detección para generar una señal electroquímica, fluorescente o cromogénica. En realizaciones que emplean la detección por

masa, E puede no tener una fracción separada para los fines de la detección. Preferiblemente, el grupo de detección genera una señal fluorescente.

5 Las etiquetas moleculares dentro de una pluralidad se seleccionan de forma que cada una tenga una característica de separación única y/o una propiedad óptica única con respecto a los demás miembros de la misma pluralidad. En un aspecto, la característica de separación cromatográfica o electroforética es el tiempo de retención en un conjunto de condiciones de separación estándar en la técnica, por ejemplo voltaje, presión de la columna, tipo de columna, fase móvil, medio de separación electroforético y similares. En otro aspecto, la propiedad óptica es una propiedad de fluorescencia, como el espectro de emisión, la duración de la fluorescencia, la intensidad de la fluorescencia a una determinada longitud de onda o banda de longitudes de onda y similares. Preferiblemente, la propiedad de fluorescencia es la intensidad de la fluorescencia. Por ejemplo, cada etiqueta molecular de una pluralidad puede tener las mismas propiedades de emisión fluorescente, pero cada una diferirá de las demás en virtud de un tiempo de retención único. Por otra parte, dos o más etiquetas moleculares de una pluralidad pueden tener unos tiempos de retención o migración idénticos, pero presentarán unas propiedades fluorescentes únicas, por ejemplo espectros de emisión espectralmente resolubles, para que todos los miembros de la pluralidad se puedan distinguir mediante la combinación de la separación molecular con la medición de la fluorescencia.

10 Preferiblemente, las etiquetas moleculares liberadas se detectan mediante separación electroforética y la fluorescencia de un grupo de detección. En estas realizaciones, las etiquetas moleculares que presentan unas propiedades de fluorescencia sustancialmente idénticas tienen movilidades electroforéticas diferentes, de forma que en condiciones de separación se forman picos distintos en un electroferograma. Preferiblemente, las pluralidades de etiquetas moleculares de la invención se separan mediante aparatos de electroforesis por capilaridad convencionales, bien en presencia o en ausencia de una matriz de cribado convencional. Algunos ejemplos de aparatos de electroforesis por capilaridad incluyen Applied Biosystems (Foster City, CA) modelos 310, 3100 y 3700; Beckman (Fullerton, CA) modelo P/ACE MDQ; Amersham Biosciences (Sunnyvale, CA) MegaBACE 1000 o 4000; el sistema de análisis genético SpectruMedix; y similares. La movilidad electroforética es proporcional a $q/M^{2/3}$, donde q es la carga sobre la molécula y M es la masa de la molécula. Preferiblemente, la diferencia en la movilidad en las condiciones de la determinación entre las etiquetas electroforéticas más cercanas será al menos de 0,001, por lo general de 0,002, más habitualmente al menos de 0,01, e incluso de 0,02 aproximadamente o superior.

15 Preferiblemente, en este aparato convencional, las movilidades electroforéticas de las etiquetas moleculares de una pluralidad difieren al menos en un uno por ciento y, más preferiblemente, al menos en un porcentaje que oscila entre el 1-10 por ciento. Las etiquetas moleculares son identificadas y cuantificadas mediante el análisis de un perfil de separación o, más concretamente, un electroferograma y estos valores están correlacionados con las cantidades y los tipos de dímeros del receptor presentes en una muestra. Por ejemplo, durante o después de una separación electroforética, las etiquetas moleculares son detectadas o identificadas registrando las señales de fluorescencia y los tiempos de migración (o las distancias de migración) de los compuestos separados, o bien elaborando una gráfica de la fluorescencia relativa y el orden de migración de las etiquetas moleculares (por ejemplo, como un electroferograma). Preferiblemente, la presencia, ausencia y/o las cantidades de etiquetas moleculares se miden empleando uno o más estándares divulgados por Williams et al, Publicación de la patente estadounidense 2003/0170734A1, que se incorpora al presente como referencia.

20 Las pluralidades de etiquetas moleculares también pueden estar diseñadas para la separación mediante cromatografía, basándose en una o más características físicas entre las que se incluyen, a título meramente enunciativo, el peso molecular, la forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, polaridad o similares, por ejemplo como se divulga en la Publicación de la patente estadounidense 2003/0235832, que se incorpora al presente como referencia. Se selecciona una técnica de separación cromatográfica basándose en parámetros como el tipo de columna, la fase sólida, la fase móvil, etc. y, a continuación, se selecciona una pluralidad de etiquetas moleculares que pueden ser separadas para formar distintos picos o bandas en una única operación. Varios factores determinan la técnica de HPLC seleccionada para su uso en la invención, incluyendo el número de etiquetas moleculares a detectar (es decir, el tamaño de la pluralidad), las cantidades estimadas de cada etiqueta molecular que se generarán en los ensayos, la disponibilidad y facilidad de sintetización de etiquetas moleculares que son candidatas para el conjunto que se empleará en ensayos multiplexados, la modalidad de detección empleada y la disponibilidad, solidez, coste y facilidad de manejo de la instrumentación de la HPLC, las columnas y solventes. Por lo general, son preferibles las columnas y técnicas apropiadas para analizar cantidades limitadas de muestra y que proporcionan las máximas separaciones de resolución. Se pueden encontrar orientaciones para realizar estas selecciones en la bibliografía, por ejemplo en Snyder et al, Practical HPLC Method Development, (John Wiley & Sons, Nueva York, 1988); Millner, «High Resolution Chromatography: A Practical Approach», Oxford University Press, Nueva York (1999), Chi-San Wu, «Column Handbook for Size Exclusion Chromatography», Academic Press, San Diego (1999), y Oliver, «HPLC of Macromolecules: A Practical Approach, Oxford University Press», Oxford, Inglaterra (1989). En particular, existen procedimientos disponibles para el desarrollo sistemático y la optimización de determinadas condiciones de las separaciones cromatográficas, tales como el tipo de columna, la fase sólida y similares, por ejemplo Haber et al, J. Chromatogr. Sci., 38: 386-392 (2000); Outinen et al, Eur. J. Pharm. Sci., 6: 197-205 (1998); Lewis et al, J. Chromatogr., 592: 183-195 y 197-208 (1992); etc. Un ejemplo de sistema de instrumentación de HPLC

adecuado para su uso con la presente invención es el sistema Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

5 En un aspecto, la etiqueta molecular E es (M, D), donde M es una fracción modificadora de la movilidad y D es una fracción de detección. La notación «(M, D)» se emplea para indicar que el orden de las fracciones M y D puede ser tal que cualquiera de las fracciones puede estar adyacente al enlace de clivaje L. Es decir, «B-L-(M, D)» designa el compuesto de unión de cualquiera de las dos formas: «B-L-M-D» o «B-L-D-M».

10 La fracción de detección D puede ser una etiqueta o un tinte fluorescente, una etiqueta o un tinte cromogénico, una etiqueta electroquímica, etc. Preferiblemente D es un tinte fluorescente. Algunos ejemplos de tintes fluorescentes para su uso con la invención incluyen tintes de rodamina solubles en agua, fluoresceínas, 4,7-diclorofluoresceínas, tintes de benzoxanteno y tintes de transferencia de energía, divulgados en las referencias siguientes: Handbook of Molecular Probes and Research Reagents, 8ª ed., (Molecular Probes, Eugene, 2002); Lee et al, Patente estadounidense 6.191.278; Lee et al, Patente estadounidense 6.372.907; Menchen et al, Patente estadounidense 6.096.723; Lee et al, Patente estadounidense 5.945.526; Lee et al, Nucleic Acids Research, 25: 2816-2822 (1997); Hobb, Jr., Patente estadounidense 4.997.928; Khanna et al, Patente estadounidense 4.318.846; etc.

15 Preferiblemente, D es una fluoresceína o un derivado de la fluoresceína.

20 En una realización ilustrada en la Fig. 3A, los compuestos de unión comprenden un anticuerpo biotinilado (300) como fracción de unión. Las etiquetas moleculares están unidas a la fracción de unión (300) por medio de un puente (306) de estreptavidina o avidina. Preferiblemente, en la práctica, la fracción de unión (300) se hace reaccionar primero con un complejo diana, después de lo cual se añade la estreptavidina o avidina (304) para formar un complejo de anticuerpo-biotina-avidina (305). A estos complejos (305) se añaden (308) etiquetas moleculares biotiniladas (310) para formar compuesto de unión (312).

25 En otra realización más ilustrada en la Fig. 3B, los compuestos de unión comprenden un anticuerpo (314) derivatizado con una fracción multifuncional (316) que contiene múltiples grupos funcionales (318) que son precursores de las etiquetas moleculares a los que se les ha hecho reaccionar (320) para obtener un compuesto de unión final que presenta múltiples etiquetas moleculares (322) unidas. Algunos ejemplos de fracciones multifuncionales incluyen el aminodextrano y materiales similares.

30 Una vez que cada uno de los compuestos de unión es derivatizado por separado mediante una etiqueta molecular diferente, se agrupa con otros compuestos de unión para formar una pluralidad de compuestos de unión. Habitualmente, cada clase de compuesto de unión diferente se encuentra presente en una composición en la misma proporción; no obstante, las proporciones se pueden variar en función de la elección del diseño, para que un compuesto de unión o un subconjunto de compuestos de unión concreto estén presentes en mayor o menor proporción, dependiendo de la idoneidad o de los requisitos para una determinada realización o ensayo. Los factores que pueden afectar a esta elección del diseño incluyen, a título meramente enunciativo, la afinidad del anticuerpo y su avidez por una diana concreta, la prevalencia relativa de una diana, las características fluorescentes de una fracción de detección de una etiqueta molecular, etc.

35

B. Especies activas que producen la fracción inductora del clivaje

Una fracción inductora del clivaje, o un agente de clivaje, es un grupo que produce una especie activa capaz de clivar un enlace clivable, preferiblemente mediante oxidación. Preferiblemente, la especie activa es una especie química que presenta una actividad efímera, de forma que sus efectos inductores del clivaje se producen solo en las proximidades del lugar donde se generó. O bien la especie activa es inherentemente efímera, para no generar un ruido de fondo significativo más allá de la proximidad de su creación, o bien se emplea un depurador que depure de forma eficiente las especies activas, de forma que no estén disponibles para reaccionar con enlaces clivables más allá de una corta distancia con respecto al lugar en el que se generaron. Algunos ejemplos de especies activas incluyen oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, NADH y radicales de hidroxilo, radical fenoxi, superóxido, etc.

40 Algunos ejemplos de neutralizadores para las especies activas que causan oxidación incluyen los polienos, carotenoides, vitamina E, vitamina C, N-conjugados aminoácido-pirrol de tirosina, histidina, y glutatona, y similares, por ejemplo Beutner et al, Meth. Enzymol., 319: 226-241 (2000).

45

Una consideración importante para diseñar ensayos que emplean una fracción inductora del clivaje y un enlace clivable es que no pueden estar tan alejados entre sí, cuando se unen a un complejo del receptor, que la especie activa generada por la fracción inductora del clivaje no pueda clivar de forma eficiente el enlace de clivaje. En un aspecto, los enlaces clivables se encuentran preferiblemente a menos de 1000 nm, y preferiblemente a 20-200 nm, de una fracción inductora del clivaje unida. Más preferiblemente, para las fracciones inductoras del clivaje del fotosensibilizador que generan oxígeno singlete, los enlaces clivables se encuentran a unos 20-100 nm de un fotosensibilizador en un complejo del receptor. El rango en el que una fracción inductora del clivaje puede clivar efectivamente un enlace clivable (es decir, clivar suficiente etiqueta molecular para generar una señal detectable) se denomina en el presente «proximidad efectiva». Un experto en el campo reconoce que la proximidad efectiva de un

50

55

sensibilizador concreto puede depender de los detalles de un diseño de ensayo concreto y puede estar determinada o ser modificada por la experimentación rutinaria.

5 Un sensibilizador es un compuesto que puede ser inducido para generar un intermedio reactivo, o una especie, por lo general oxígeno singlete. Preferiblemente, un sensibilizador empleado de conformidad con la invención es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores incluidos en el ámbito de aplicación de la invención son compuestos que, tras la excitación por calor, luz, radiación ionizante o activación química, liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros más conocidos de esta clase de compuestos incluyen los endoperóxidos, tales como 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno endoperóxido, 9,10- difenilantracén-9,10-endoperóxido y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 10 5,12-endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de luz por parte de estos compuestos libera oxígeno singlete. Otros sensibilizadores se divulgan en las referencias siguientes: Di Mascio et al, FEBS Lett., 355: 287 (1994) (peroxidasas y oxigenasas); Kanofsky, J.Biol. Chem. 258: 5991-5993 (1983) (lactoperoxidasa); Pierlot et al, Meth. Enzymol., 319: 3-20 (2000) (lisis térmica de endoperóxidos); etc. La unión de un agente de unión a la fracción inductora del clivaje puede ser directa o indirecta, covalente o no covalente y se puede realizar mediante técnicas bien conocidas, habitualmente disponibles en la bibliografía. Véase, por ejemplo «Immobilized Enzymes», Ichiro Chibata, Halsted Press, Nueva York (1978); Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970).

Como se ha mencionado anteriormente, la fracción inductora del clivaje preferible de conformidad con la presente invención es un fotosensibilizador que produce oxígeno singlete. Para los fines del presente, un «fotosensibilizador» es una molécula que absorbe luz y que cuando se activa mediante la luz convierte el oxígeno molecular en oxígeno 20 singlete. Los fotosensibilizadores se pueden unir directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes, al agente de unión de un reactivo de clase específica. Existen orientaciones para elaborar estas composiciones, particularmente para anticuerpos como agentes de unión, disponibles en la literatura, como, por ejemplo, en los campos de la terapia fotodinámica, el inmunodiagnóstico, etc. Algunos ejemplos de referencias son los siguientes: Ullman, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426-5430 (1994); Strong et al, Ann. New York Acad. Sci., 745: 297-320 (1994); Yarmush et al, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst, 10: 197-252 (1993); Pease et al, 25 Patente estadounidense 5.709.994; Ullman et al, Patente estadounidense 5.340.716; Ullman et al, Patente estadounidense 6.251.581; McCapra, Patente estadounidense 5.516.636; etc.

Existe una gran variedad de fuentes de luz disponibles para fotoactivar los fotosensibilizadores que generan oxígeno singlete. Se pueden utilizar fuentes tanto monocromáticas como policromáticas, siempre que la fuente sea lo suficientemente intensa como para producir suficiente oxígeno singlete en una duración de tiempo práctica. La longitud de la irradiación depende de la naturaleza del fotosensibilizador, la naturaleza del enlace clivable, el poder de la fuente de irradiación y su distancia de la muestra, etc. En general, el periodo para la irradiación puede ser desde inferior a un microsegundo aproximadamente hasta unos 10 minutos, por lo general en un rango aproximado de un milisegundo a unos 60 segundos. La intensidad y la longitud de la irradiación deberán ser suficientes para excitar al menos en torno al 0,1% de las moléculas fotosensibilizadoras, habitualmente al menos el 30% de las 30 moléculas fotosensibilizadoras y preferiblemente casi todas las moléculas fotosensibilizadoras. Algunos ejemplos de fuentes de luz incluyen, a título meramente enunciativo, láseres, como láseres de helio-neón, láseres de argón, láseres YAG, láseres He/Cd y láseres de rubí; fotodiodos; lámparas de vapor de mercurio, sodio y xenón; lámparas incandescentes, como lámparas de tungsteno y tungsteno/halógenas; lámparas de destellos; etc. A modo de ejemplo, se emplea un dispositivo de fotoactivación divulgado en Bjomson et al, Publicación de patente internacional WO 03/051669. Dicho brevemente, el dispositivo de fotoactivación es un haz de diodos emisores de luz (LED) montados en una carcasa que permite la iluminación simultánea de todos los pocillos en una placa de 96 pocillos. Un LED adecuado para su uso en la presente invención es un emisor GaAlAs IR de alta potencia, como el modelo OD-880W fabricado por OPTO DIODE CORP. (Newbury Park, CA).

Algunos ejemplos de fotosensibilizadores que se pueden emplear en la presente invención son los que presentan las mencionadas propiedades y se recogen en las referencias siguientes: Singh and Ullman, Patente estadounidense 5.536.834; Li et al, Patente estadounidense 5.763.602; Martin et al, Methods Enzymol., 186: 635-645 (1990); Yarmush et al, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst, 10: 197-252 (1993); Pease et al, Patente estadounidense 5.709.994; Ullman et al, Patente estadounidense 5.340.716; Ullman et al, Patente estadounidense 6.251.581; McCapra, Patente estadounidense 5.516.636; Thetford, Publicación de patente europea 0484027; 50 Sessler et al, SPIE, 1426: 318-329 (1991); Magda et al, Patente estadounidense 5.565.552; Roelant, Patente estadounidense 6.001.673; etc.

Al igual que en el caso de los sensibilizadores, en determinadas realizaciones un fotosensibilizador puede estar asociado con un soporte de fase sólida, estando unido mediante un enlace covalente o no covalente a la superficie del soporte o incorporado al cuerpo del soporte. En general, el fotosensibilizador está asociado con el soporte en una cantidad necesaria para alcanzar la cantidad necesaria de oxígeno singlete. Por lo general, la cantidad de 55 fotosensibilizador se determina empíricamente.

En una realización, un fotosensibilizador está incorporado a una partícula de látex para formar perlas fotosensibilizadoras, por ejemplo como se divulga en Pease et al., Patente estadounidense 5.709.994; Pollner,

Patente estadounidense 6.346.384; y Pease et al, Publicación de PCT WO 01/84157. Alternativamente, las perlas fotosensibilizadoras se pueden preparar uniendo mediante un enlace covalente un fotosensibilizador, como rosa bengala, a las perlas de látex de 0,5 micrones, mediante grupos de clorometilo sobre el látex para proporcionar un grupo de unión a éster, tal como se describe en J. Amer. Chem. Soc, 97: 3741 (1975). El uso de perlas fotosensibilizadoras se ilustra en la Fig. 3C. Tal como se describe en la Fig. 1C para la detección de heterodúplex, los complejos (330) se forman después de combinar reactivos (1122) con una muestra. Esta reacción se puede realizar, por ejemplo, en una placa de microtitulación convencional de 96 o de 384 pocillos, o similares, que tenga una membrana de filtro que forme una pared, por ejemplo, en la parte inferior de los pocillos, que permita retirar los reactivos mediante la aplicación de vacío. Esto permite cambiar cómodamente las soluciones tampón, si la solución tampón necesaria para la unión específica de compuestos de unión es diferente a la necesaria para la generación de oxígeno singlete o para la separación. Por ejemplo, en el caso de los compuestos de unión basados en anticuerpos, se necesita una solución tampón con un alto contenido en sal. Si se emplea la separación electroforética de las etiquetas liberadas, entonces se consigue un mejor resultado cambiando la solución tampón por una con una concentración de sal inferior para la electroforesis. En esta realización, en lugar de unir un fotosensibilizador directamente a un compuesto de unión, como un anticuerpo, una sonda de clivaje comprende dos componentes: anticuerpo (332) derivatizado con una fracción de captura, como biotina (indicada en la Fig. 3C como «bio») y una perla fotosensibilizadora (338) cuya superficie está derivatizada con un agente (334) que se une específicamente con la fracción de captura, como avidina o estreptavidina. Los complejos (330) son entonces capturados (335) por las perlas fotosensibilizadoras a través de la fracción de captura, como biotina (336). Preferiblemente, si el diámetro del poro de la membrana de filtro se selecciona para que las perlas sensibilizadoras (338) no puedan pasar, entonces el cambio de solución tampón también sirve para retirar los compuestos de unión no unidos, lo que se traduce en una señal mejorada. Una vez que se ha añadido una solución tampón apropiada para la separación, si resulta necesario, las perlas fotosensibilizadoras (338) son iluminadas, a fin de generar el oxígeno singlete (342) y liberar las etiquetas moleculares (344). Estas etiquetas moleculares liberadas (346) son posteriormente separadas para formar el perfil de separación (352) y se cuantifican los dímeros radiométricamente a partir de los picos (348) y (350). Las perlas fotosensibilizadoras se pueden utilizar en formatos de ensayo homogéneos y heterogéneos.

Preferiblemente, cuando se van a detectar analitos, como receptores de superficie celular, o antígenos en una muestra fijada, la sonda de clivaje puede comprender un anticuerpo haptenado primario y una proteína de unión anti-hapteno secundaria derivatizada con múltiples moléculas fotosensibilizadoras. Un anticuerpo haptenado primario preferible es un anticuerpo biotinilado y una proteína de unión anti-hapteno secundaria preferible puede ser un anticuerpo anti-biotina o estreptavidina. Otras combinaciones de estos activos primarios y secundarios son bien conocidas en el campo, por ejemplo Haugland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Reagents, 9ª edición (Molecular Probes, Eugene, OR, 2002). Un ejemplo de combinación de estos reactivos se ilustra en la Fig. 3E. Los compuestos de unión (366 y 368) que tienen etiquetas liberables («mT₁» y «mT₂» en la Figura) y el anticuerpo primario (368) derivatizado con biotina (369) están específicamente unidos a diferentes epítopos del dímero del receptor (362) en la membrana (360). La proteína de unión específica de biotina (370), por ejemplo, estreptavidina, está unida a biotina (369) portando múltiples fotosensibilizadores (372) a la proximidad efectiva de los compuestos de unión (366 y 368). La proteína de unión específica de biotina (370) también puede ser un anticuerpo anti-biotina y los fotosensibilizadores se pueden unir a través de un grupo amino libre en la proteína, mediante procesos químicos de acoplamiento convencionales, como en Hermanson (anteriormente citado). Un ejemplo de fotosensibilizador para este uso es un éster NHS de azul de metileno preparado tal y como se divulga en Shimadzu et al, Publicación de patente europea 0510688.

Condiciones de ensayo

La siguiente discusión general de los métodos y condiciones y materiales específicos se ofrecen únicamente a título ilustrativo y sin carácter limitador. Un experto en el campo entenderá cómo se pueden adaptar los métodos descritos en el presente a otras aplicaciones, particularmente con el uso de diferentes muestras, tipos de células y complejos diana.

Para realizar los métodos de la invención, se realiza una combinación de los componentes del ensayo, incluyendo la muestra a testar, los compuestos de unión y, opcionalmente, la sonda de clivaje. Por lo general, los componentes del ensayo se pueden combinar en cualquier orden. No obstante, en determinadas aplicaciones el orden en el que se añaden puede ser importante. Por ejemplo, se puede pretender controlar la unión competitiva, como en un ensayo cuantitativo. O bien se puede pretender controlar la estabilidad de un complejo formado. En estas aplicaciones las reacciones se pueden realizar por fases y pueden exigir incubaciones para poder conseguir la mezcla completa o para poder iniciar la reacción de clivaje.

Por lo general, las cantidades de cada reactivo se determinan empíricamente. La cantidad de muestra empleada en un ensayo se determinará por el número previsto de complejos diana presentes y por los medios de separación y detección empleados para controlar la señal del ensayo. En general, las cantidades de los compuestos de unión y la sonda de clivaje se proporcionan en exceso molar con respecto a la cantidad prevista de las moléculas diana en la muestra, habitualmente a un exceso molar de al menos 1,5, más preferiblemente a un exceso de 10 o superior. En

aplicaciones específicas, la concentración empleada puede ser superior o inferior, dependiendo de la afinidad de los agentes de unión y del número previsto de moléculas diana presentes en una única célula. Cuando se desea determinar el efecto de un compuesto químico sobre una formación de complejos de superficie celular oligoméricos, el compuesto se puede añadir a las células antes de añadir las sondas, simultáneamente o con posterioridad a la adición de las mismas, dependiendo del efecto que se pretenda controlar.

La mezcla del ensayo se combina e incuba en condiciones que permiten la unión de las sondas a las moléculas de superficie celular, normalmente en un medio acuoso, por lo general a un pH fisiológico (comparable al pH al que se cultivan las células), se mantiene mediante una solución tampón a una concentración en un rango de unos 10 a 200 mM. Se pueden emplear las soluciones tampón convencionales, además de otros aditivos convencionales necesarios, tales como sales, medio de cultivo, estabilizantes, etc. Las temperaturas fisiológicas y constantes se emplean con normalidad. Normalmente las temperaturas de incubación oscilan entre unos 4°C a 70°C, habitualmente de entre unos 15°C a 45°C, más habitualmente de 25°C a 37°C. Después de la preparación de la mezcla del ensayo y la incubación para permitir que las sondas se unan a las moléculas de superficie celular, la mezcla es tratada para activar el agente de clivaje para clivar las etiquetas de los compuestos de unión que se encuentran dentro de la proximidad efectiva del agente de clivaje, liberando la etiqueta correspondiente de la superficie celular en la solución. La naturaleza de este tratamiento dependerá del mecanismo de acción del agente de clivaje. Por ejemplo, cuando se emplea un fotosensibilizador como agente de clivaje, la activación del clivaje comprenderá la irradiación de la mezcla a la longitud de onda de la luz apropiada para el sensibilizador concreto empleado.

Después del clivaje, la sonda es analizada para determinar la identidad de las etiquetas que han sido liberadas. Cuando se emplea un ensayo que utiliza una pluralidad de compuestos de unión, la separación de las etiquetas liberadas precederá por lo general a su detección. Los métodos tanto para la separación como para la detección se determinan durante el diseño de las etiquetas para el ensayo. Un modo preferible de separación emplea la electroforesis, en la que las diversas etiquetas se separan basándose en diferencias conocidas en sus movilidades electroforéticas.

Como se ha mencionado anteriormente, en algunas realizaciones, si las condiciones de la reacción de ensayo pueden interferir en la técnica de separación empleada, puede resultar necesario retirar o cambiar la solución tampón de la reacción de ensayo antes del clivaje y la separación de las etiquetas moleculares. Por ejemplo, las condiciones de ensayo pueden incluir concentraciones de sal (por ejemplo, necesarias para la unión específica) que degradan el rendimiento de la separación cuando las etiquetas moleculares se separan sobre la base de la movilidad electroforética. De este modo, las soluciones tampón con un elevado contenido en sal pueden ser retiradas, por ejemplo antes del clivaje de las etiquetas moleculares, y sustituidas por otras soluciones tampón adecuadas para la separación electroforética a través de la filtración, aspiración, dilución u otros medios.

Ejemplos

Cualquier ejemplo que no se encuadre en el ámbito de aplicación de la invención se ofrece exclusivamente para los fines de la comparación.

Fuentes de materiales empleados en los ejemplos

Los anticuerpos específicos para los receptores Her, las moléculas adaptadoras y los estándares de normalización se obtienen de distribuidores comerciales, entre los que se incluyen Labvision, Cell Signaling Technology, y BD Biosciences. Todas las líneas de células se adquirieron a ATCC. Todas las muestras de tejido humano congeladas instantáneamente se adquirieron a William Bainbridge Genome Foundation (Seattle, WA) o Bio Research Support (Boca Raton, FL) que fueron aprobadas por el Consejo de Investigación Institucional (IRB) del proveedor.

Los conjugados de etiqueta molecular-anticuerpo empleados a continuación se forman haciendo reaccionar ésteres NHS de la etiqueta molecular con una amina libre del anticuerpo indicado empleando procedimientos convencionales. Las etiquetas moleculares, identificadas a continuación por su designación «Pro_N» se divulgan en las referencias siguientes: Singh et al, Publicaciones de patentes estadounidenses 2003/017915 y 2002/0013126, que se incorporan al presente como referencia. Dicho brevemente, los compuestos de unión siguientes son conjugados de etiqueta molecular-anticuerpo monoclonal formados haciendo reaccionar un éster NHS de una etiqueta molecular con aminas libres de los anticuerpos en una reacción convencional.

Ejemplo 1

Análisis de lisados celulares para la heterodimerización de Her-2 y la fosforilación del receptor

En este ejemplo, los heterodímeros de Her1-Her2 y Her2-Her3 y los estados de fosforilación se miden en lisados celulares de diversas líneas de células tras el tratamiento con diversas concentraciones de factor de crecimiento

epidérmico (EGF) y heregulina (HRG). Las mediciones se realizan empleando tres compuestos de unión y una sonda de clivaje, tal y como se describe a continuación.

Preparación de la muestra:

1. Cultivo de una línea de células de cáncer de mama privada de suero durante una noche, antes de la utilización.
- 5 2. Estimulación de las líneas de células con EGF y/o HRG en medios de cultivo durante 10 minutos a 37°C. Algunos ejemplos de dosis de EGF/HRG son 0, 0,032, 0,16, 0,8, 4, 20, 100 nM para todas las líneas de células (por ejemplo, MCF-7, T47D, SKBR-3) salvo BT20 en la que la dosis máxima se incrementa hasta 500 nM porque la saturación no se consigue con 100 nM EGF.
- 10 3. Aspiración de los medios de cultivo, transferencia a hielo y adición de la solución tampón de lisis para el lisado de las células *in situ*.
4. Raspado y transferencia del lisado al tubo micrófugo. Incubación en hielo durante 30 min. Micrófugo a 14.000 rpm, 4°C, durante 10 min. (El centrifugado es opcional.)
5. Recopilación de supernatantes como lisados y división en alícuotas para el almacenamiento a -80°C hasta la utilización.

15 **Ensayo.**

Diseño del ensayo: Tal como se ilustra en forma de diagrama en la Fig. 4A, los heterodímeros de Her2-Her3 (900) son cuantificados ratiométricamente basándose en la unión de la sonda de clivaje (902) y los compuestos de unión (904), (906), y (908). Un fotosensibilizador indicado por «PS» se une a la sonda de clivaje (902) a través de un enlace de avidina-biotina y los compuestos de unión (904), (906), y (908) son etiquetados con las etiquetas moleculares Pro4, Pro10, y Pro 11, respectivamente. El compuesto de unión (904) es específico para un sitio de fosforilación en Her3.

El volumen total del ensayo es de 40 ul. El volumen del lisado se ajusta a 30 ul con la solución tampón de la lisis. Los anticuerpos se diluyen en la solución tampón de la lisis hasta 10ul. Típicamente se emplean entre ~5000 y 15000 equivalentes en células de lisados por reacción. El límite de detección es de ~1000 equivalentes en células de lisados.

Procedimiento: Las concentraciones finales de los compuestos de unión antes de la mezcla (es decir, los conjugados de etiqueta molecular o biotina-anticuerpo) en la reacción:

Pro4_anti-Her-2: 0,1 ug/ml

Pro10_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml

30 Pro11_anti-Her-3: 0,1 ug/ml

Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,1 ug/ml

Biotina_anti-Her-2: 1-2 ug/ml

1. Para someter a ensayo 96 pocillos, añadir 10 ul de mezcla del anticuerpo a 30 ul de lisado e incubar durante una hora a RT.
- 35 2. Añadir 2 ul de sonda de clivaje derivatizada de estreptavidina (final 2 ug/pocillo) para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 45 minutos.
3. Añadir 150 ul de PBS con BSA al 1% a la placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250) e incubar durante una hora a RT para bloquear.
- 40 4. Vaciar la placa de filtrado mediante succión por vacío. Transferir las reacciones del ensayo a la placa de filtrado y aplicar vacío para vaciar.
5. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
6. Añadir 200 ul de solución tampón de iluminación y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
7. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar durante 20 min.

ES 2 422 884 T3

8. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis, empleando un instrumento ABI13100 CE con un capilar de 22 cm (condiciones de inyección: 5 kV, 75 seg, 30°C; condiciones de funcionamiento: 600 seg, 30°C).

Las soluciones tampón de ensayo son las siguientes:

5 Solución tampón de lisis (recién hecha y almacenada sobre hielo)

Final	ul	Reserva
1% Triton X-100	1000	10%
20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	200	1 M
100 mM NaCl	200	5M
50 mM NaF	500	1 M
50 mM Na beta-glicerofosfato	1000	0,5 M
1 mM Na ₃ VO ₄	100	0,1 M
5 mM EDTA	100	0,5 M
10 ug/ml pepstatina	100	1 mg/ml
1 comprimido (por 10 ml) de inhibidor de proteasa Roche Complete (#1836170)	N/A	N/A
Agua	6500	N/A
	10 ml	Total

Solución tampón de lavado (almacenada a 4°C)

Final	ml	Reserva
1% NP-40	50	10%
1xPBS	50	10x
150 mM NaCl	15	5M
5 mM agua con EDTA	5	0,5 M
Agua	380	N/A
	500 ml	Total

Solución tampón de iluminación:

10

<u>Final</u>	<u>ul</u>	<u>Reserva</u>
0.005x PBS	50	1x
CE std	3	100x
10 mM Tris-HCl (pH 8.0)		0,1M
10pMA160		1nM
10pMA315		1nM

10pMHABA	1nM
Agua	<u>10.000 N/A</u>
	10 ml Total

Análisis de datos:

- 5 1. Normalizar la señal de las unidades de fluorescencia relativa (RFU) de cada etiqueta molecular frente al estándar de referencia CE A315 (un monofosfato de desoxiadenosina derivatizado de fluoresceína que tiene una posición pico conocida con respecto a las etiquetas moleculares del ensayo tras la separación electroforética).
2. Sustraer las RFU del control de fondo «no lisado» de las correspondientes señales de las etiquetas moleculares.
- 10 3. Informar la heterodimerización para Her-1 o Her-3 como la ratiométrica de RFU correspondiente para RFU de Pro4_anti-Her-2 de los pocillos de ensayo utilizando biotina-anti-Her-2.
4. Informar la fosforilación del receptor para Her-1,2,3 como RFU de la ratiométrica de Pro2_PT100 anti-fosfo-Tir para RFU de Pro4_anti-Her-2 de los pocillos de ensayo empleando biotina-anti-Her-2.

15 Los resultados del ensayo se ilustran en las Fig. 4B-4H. La Fig. 4B muestra la cantidad de incrementos de heterodímeros de Her1-Her2 en las células MCF-7 con un aumento de la concentración de EGF, mientras que la cantidad del mismo dímero no muestra básicamente ninguna variación con un aumento de la concentración de HRG. La Fig. 4 muestra el resultado opuesto para los heterodímeros de Her2-Her3. Es decir, la cantidad de heterodímeros de Her2-Her3 aumenta en las células MCF-7 con un aumento de las concentraciones de HRG, mientras que la cantidad del mismo dímero no muestra básicamente ningún cambio con un aumento de la concentración de EGF.

20 Las Fig. 4D y 4E muestran la cantidad de incrementos de heterodímeros de Her1-Her2 en las células SKBR-3 y las células BT-20, respectivamente, con un aumento de las concentraciones de EGF.

Ejemplo 2

Análisis de lisados de tejido para la heterodimerización de Her2 y la fosforilación del receptor

En este ejemplo, los heterodímeros de Her1-Her2 y Her2-Her3 y los estados de fosforilación se miden en lisados de tejido de muestras de cáncer de mama humanas.

25 **Preparación de la muestra:**

1. Los tejidos congelados de manera instantánea son alterados mecánicamente en estado congelado por corte.
2. Transferir tejidos a un tubo micrófugo y añadir 3x volúmenes de tejido de solución tampón de lisis (del apéndice I). A continuación, mezclar con agitador vortex para dispersar los tejidos en la solución tampón.
- 30 3. Incubar en hielo durante 30 min., agitando con vortex para mezclar.
4. Centrifugar a 14.000 rpm, 4°C, durante 20 min.
5. Recoger los supernatantes y lisados y determinar la concentración total de proteína con un ensayo BCA (Pierce) empleando una pequeña alícuota.
6. Dividir el resto en alícuotas para el almacenamiento a -80°C hasta el uso.

35 **Diseño del ensayo:**

1. El volumen total del ensayo es de 40 ul.
2. Los lisados se testan en series de titulación de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31 ug de equivalentes totales y se ajusta el volumen a 30 ul con la solución tampón de lisis. Los datos de las series de titulación confirman la especificidad de las señales de dimerización o fosforilación.

3. Una mezcla de anticuerpo universal que comprende todos los eTag-anticuerpos diluidos en solución tampón de lisis se emplea a las concentraciones siguientes.
4. Se añade biotina-anticuerpo individual para cada receptor por separado a las reacciones.
5. Se realizan tres ensayos de eTag con cada lisado de tejido, empleando cada uno una biotina-anticuerpo diferente, correspondiente a la dimerización del receptor específica que se pretende medir.
6. Se determina el nivel de expresión de cada receptor de los diferentes ensayos que contienen biotina-anticuerpo específico para el receptor.
7. Las señales de dimerización y fosforilación se determinan ratiométricamente solo en el ensayo que contiene la biotina-anti-Her-2.

10 Controles del ensayo: Las líneas de células MCF-10A y MCF-7 se emplean como controles cualitativos negativos y positivos, respectivamente. Las líneas de células son estimuladas o no estimuladas con 100 nM de EGF o 100 nM de HRG. La solución tampón de lisis se incluye como control de fondo cuando se sustituyen las muestras de tejido.

Concentraciones finales de anticuerpos antes de la mezcla en las reacciones:

Mezcla de anticuerpos universal:

- 15 Pro4_anti-Her-2: 0.1 ug/ml
- Pro10_anti-Her-1: 0,05 ug/ml
- Pro11_anti-Her-3: 0,1 ug/ml
- Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,01 ug/ml

20 Anticuerpo de biotina individual:

- Biotina_anti-Her-1: 2 ug/ml
- Biotina_anti-Her-2: 2 ug/ml
- Biotina_anti-Her-3: 2 ug/ml

Procedimiento:

- 25 1. Preparar la mezcla de reacción del anticuerpo, añadiendo anticuerpo con biotina a la mezcla de anticuerpo universal.
2. Para someter a ensayo 96 pocillos, añadir 10 ul de mezcla de reacción universal a 30 ul de lisado e incubar durante una hora a RT.
- 30 3. Añadir 2 ul de sonda de clivaje derivatizada de estreptavidina (final 2 ug/pocillo) para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 45 minutos.
4. Añadir 150 ul de PBS con BSA al 1% a la placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250) e incubar durante una hora a RT para bloquear.
5. Vaciar la placa de filtrado mediante succión por vacío. Transferir las reacciones del ensayo a la placa de filtrado y aplicar vacío para vaciar.
- 35 6. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
7. Añadir 200 ul de solución tampón de iluminación y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
8. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar durante 20 min.
9. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis, empleando un instrumento de electroforesis por capilaridad ABI3100 con un capilar de 22 cm (condiciones de inyección: 5 kV, 75 seg, 30°C; condiciones de funcionamiento: 600 seg, 30°C).
- 40

Análisis de datos:

1. Normalizar la señal de RFU de cada etiqueta molecular frente al estándar de referencia CE A315.
2. Determinar los valores de corte de RFU (cada uno para la dimerización o fosforilación) por debajo de los cuales no se calculan los ratios, porque las señales resultan demasiado bajas para ser fiables. Por debajo de los valores de corte, las señales de RFU no se pueden someter a titulación en la serie de diluciones de lisado testada. Los valores se pueden determinar con un conjunto amplio de tejidos normales en los que se espera que las señales de dimerización y fosforilación estén ausentes o se mantengan en niveles mínimos. Estos valores también representan el nivel basal de dimerización o fosforilación sobre los tejidos normales con los que se compararán los tejidos tumorales.
3. Para la minoría de tejidos normales, si están presentes, con valores de RFU por encima del nivel de corte, determinar el nivel de RFU individual y las lecturas ratiométricas de los picos de heterodimerización o fosforilación de Her-1 o Her-3 detectados. Estas muestras representan casos atípicos que se deberían emplear como controles de donantes correspondientes para las respectivas muestras de tejido tumoral durante la puntuación.
4. Para todas las muestras tumorales que muestran señales de RFU susceptibles de titulación, emplear la señal más baja de cada Her-1, Her-2, Her-3, o de la fosforilación de la serie de titulación del lisado tisular como fondo. Sustraer este fondo de las señales de las etiquetas moleculares de los lisados de alta dosis (por ejemplo, 40 ug) para producir las señales de RFU específicas. Si no hay ninguna respuesta de la dosis de la señal en la serie de titulación, todas las señales (que son habitualmente muy bajas) se consideran de fondo, sin que se pueda emplear ninguna señal específica para el análisis ratiométrico.
5. Notificar la heterodimerización para Her-1 o Her-3 como la ratiométrica de RFU específica correspondiente para las RFU específicas de Pro4_anti-Her-2. Si no se obtiene ninguna RFU específica, la dimerización es negativa.
6. Notificar la fosforilación del receptor para Her-1,2,3 como las RFU específicas de la ratiométrica de Pro2_anti-fosfo-Tir para las RFU específicas de Pro4_anti-Her-2. Si no se obtiene ninguna RFU específica, la fosforilación es negativa.

En las Fig. 5A-5C, los datos mostrados son representativos de múltiples muestras de tejido mamario de pacientes testadas con ensayos de la invención. El estado clínico de Her-2 de la inmunohistoquímica (DAKO Herceptest) de 9 de cada 10 muestras tumorales fue negativo, lo que indica una tinción de Her-2 indetectable, o bien una tinción de menos del 10% de las células tumorales, o una tinción imperceptible o apenas perceptible sobre parte de la membrana celular de más del 10% de las células tumorales. Los ensayos de la invención determinaron la expresión de Her-1, Her-2 y Her-3 tanto en los tejidos normales como en los tumorales. La heterodimerización de Her1 y Her2 y de Her2 y Her3 se detectó solamente en tejido tumoral, pero no en ningún tejido normal.

Ejemplo 3

Análisis de lisados celulares para la homodimerización de Her1 y Her2 y la fosforilación del receptor

La preparación de la muestra se realizó básicamente como se describe en el Ejemplo 2. La homodimerización de Her1 se indujo tratando las líneas de células con EGF o TGF α . Para la homodimerización de Her2 que no tiene un ligando, las células SKBR-3 o MDA-MD-453 no estimuladas que presentan una sobreexpresión de Her2 se comparan con las células MCF-7 no estimuladas que expresan un bajo nivel de Her2.

Diseño del ensayo: Un anticuerpo monoclonal específico para el receptor se conjuga por separado con una etiqueta molecular o con biotina (que es posteriormente unida a un fotosensibilizador mediante un puente de avidina), de forma que la sonda de clivaje y el compuesto de unión compiten por unirse al mismo epítipo en este ejemplo. Se utiliza otro compuesto de unión que consiste en un segundo anticuerpo que reconoce un epítipo de solapamiento en el receptor, de forma que se puede generar una señal ratiométrica como medida de la homodimerización. La señal obtenida del segundo anticuerpo también proporciona una medida de la cantidad total de receptor en una muestra. La cantidad total de receptor se determina en un pocillo de ensayo separado. La fosforilación del receptor se puede cuantificar junto con la homodimerización o con la cantidad total del receptor.

Procedimiento: El volumen del ensayo es de 40 ul y el procedimiento general es similar al del Ejemplo 2. Se preparan dos pocillos de ensayo, A y B, para cada muestra, a fin de cuantificar la homodimerización y la cantidad total del receptor por separado.

Para la cuantificación de los homodímeros de Her1-Her1:

Concentraciones finales en la mezcla del anticuerpo en el pocillo de ensayo A:

Pro2_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml

Biotina_anti-Her-1: 1-2 ug/ml

Concentraciones finales en la mezcla del anticuerpo en el pocillo de ensayo B:

Pro10_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml

Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,1 ug/ml

5 Biotina_anti-Her-I: 1-2 ug/ml

Para la cuantificación de los homodímeros de Her2-Her2:

Concentraciones finales en la mezcla del anticuerpo en el pocillo de ensayo A:

10 Pro4_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml

Biotina_anti-Her-1: 1-2 ug/ml

Concentraciones finales en la mezcla del anticuerpo en el pocillo de ensayo B:

15 Pro4_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml

Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,1 ug/ml

Biotina_anti-Her-1: 1-2 ug/ml

Análisis de datos:

- 20
1. Normalizar la señal de RFU de cada etiqueta molecular frente al estándar de referencia CE A315.
 2. Sustraer las RFU del control de fondo «no lisado» de las correspondientes señales de las etiquetas moleculares.
 3. Informar la homodimerización para Her-1 o Her-2 como las RFU normalizadas correspondientes del pocillo de ensayo A como la ratiométrica para las RFU normalizadas de la cantidad total del receptor del correspondiente pocillo de ensayo B.
- 25
4. Informar la fosforilación del receptor para el homodímero de Her-1 o Her-2 como las RFU normalizadas de Pro2_PT100 anti-fosfo-Tir del pocillo de ensayo B como la ratiométrica para las RFU normalizadas de la cantidad total de receptor del mismo pocillo de ensayo B.

30 Los resultados del ensayo se ilustran en las Fig. 6A-6B y la Fig. 7. La Fig. 6A muestra que la cantidad de homodímeros de Her1-Her1 en las células BT-20 aumenta con una mayor concentración de EGF. La Fig. 6B muestra que la cantidad de fosforilación de Her1 en las células BT-20 aumenta con una mayor concentración de EGF. La detección de homodímeros de Her2-Her2 se demostró mediante la comparación de señales de las células SKBR-3 que expresaban Her2 con las señales de las células MCF-7 que expresaban un nivel reducido de Her2 en la superficie celular. Como se muestra en los diagramas de la Fig. 7, no se detectó ninguna señal del homodímero de Her2-Her2 susceptible de titulación específica en las células MCF-7, mientras que las señales del homodímero de Her2-Her2 en las células SKBR-3 estaban claramente por encima de las señales de las células MCF-7.

35

Ejemplo 4

Análisis de lisados celulares para la heterodimerización de Her1-Her3 y la fosforilación del receptor

Las muestras se preparan como sigue:

- 40
1. Cultivo de una línea de células de cáncer de mama privada de suero durante una noche, antes de la utilización.

2. Estimulación de las líneas de células con HRG en medios de cultivo durante 10 minutos a 37°C. Algunos ejemplos de dosis de HRG son 0, 0,032, 0,16, 0,8, 4, 20, 100 nM para las células T47D.
3. Aspiración de los medios de cultivo, transferencia a hielo y adición de la solución tampón de lisis para el lisado de las células *in situ*.
- 5 4. Raspado y transferencia del lisado al tubo micrófugo. Incubación en hielo durante 30 min. Micrófugo a 14.000 rpm, 4°C, durante 10 min. (El centrifugado es opcional.)
5. Recopilación de supernatantes como lisados y división en alícuotas para el almacenamiento a -80°C hasta la utilización.

10 Diseño del ensayo: El volumen total del ensayo es de 40 ul. El volumen del lisado se ajusta a 30 ul con la solución tampón de la lisis. Los anticuerpos se diluyen en la solución tampón de la lisis hasta 5 ul. Típicamente se emplean entre ~5000 y 50.000 equivalentes en células de lisados por reacción. Concentraciones finales de anticuerpos antes de la mezcla en la reacción:

Pro10_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml

Proll_anti-Her-3: 0,1 ug/ml

15 Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,1 ug/ml

Biotina_anti-Her-3: 1-2 ug/ml

1. Para someter a ensayo 96 pocillos, añadir 5 ul de mezcla del anticuerpo a 30 ul de lisado e incubar durante una hora en RT.
- 20 2. Añadir 5 ul de tijera molecular derivatizada de estreptavidina (final 4 ug/pocillo) para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 45 minutos.
3. Añadir 150 ul de PBS con BSA al 1% a la placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250) e incubar durante una hora en RT para bloquear.
4. Vaciar la placa de filtrado mediante succión por vacío. Transferir las reacciones del ensayo a la placa de filtrado y aplicar vacío para vaciar.
- 25 5. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
6. Añadir 200 ul de solución tampón de iluminación y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
7. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar durante 20 min.
8. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis, empleando un instrumento de electroforesis por capilaridad ABI3100 con un capilar de 22 cm (condiciones de inyección: 5 kV, 425 seg, 30°C; condiciones de funcionamiento: 600 seg, 30°C).
- 30

Análisis de datos:

1. Normalizar la señal de RFU de cada indicador de eTag frente al estándar de referencia CE A315.
2. Sustraer las RFU del control de fondo «no lisado» de las correspondientes señales del indicador de eTag.
- 35 3. Informar la heterodimerización como la ratiométrica de RFU de Pro 10 derivada de Her-1 frente a las RFU de Prol 1 de anti-Her-3.
4. Informar la fosforilación del receptor para Her-1/3 como RFU de la ratiométrica de Pro2_PT100 anti-fosfo-Tir para RFU de Pro 1 I_anti-Her-3 de los pocillos de ensayo empleando biotina-anti-Her-3.

Los resultados del ensayo se ilustran en las Fig. 8A y SB. Los datos muestran que tanto la heterodimerización de Her—Her3 como la fosforilación del dímero aumentan con unas concentraciones mayores de HRG.

40 Ejemplo 5

Aumento de la expresión del dímero del receptor Her-Her2 en líneas de células cancerosas en respuesta al incremento del factor de crecimiento epidérmico

En este ejemplo, los heterodímeros de Her1-Her3 se miden en lisados celulares de las líneas de células cancerígenas 22Rv1 y A549 tras el tratamiento con diversas concentraciones de factor de crecimiento epidérmico (EGF). Las mediciones se realizan empleando tres compuestos de unión y una sonda de clivaje, tal y como se describe a continuación.

5 Preparación de la muestra:

1. Cultivo de una línea de células de cáncer de mama privada de suero durante una noche, antes de la utilización.
2. Estimulación de las líneas de células con EGF en medios de cultivo durante 10 minutos a 37°C. Algunos ejemplos de dosis de EGF aplicados a ambas líneas de células oscilaban entre 0-100 nM.
- 10 3. Aspiración de los medios de cultivo, transferencia a hielo y adición de la solución tampón de lisis para el lisado de las células *in situ*.
4. Raspado y transferencia del lisado al tubo micrófugo. Incubación en hielo durante 30 min. Micrófugo a 14.000 rpm, 4°C, durante 10 min. (El centrifugado es opcional.) Determinación de la concentración de proteína. 5. Recopilación de supernatantes como lisados y división en alícuotas para el almacenamiento a -80°C hasta la utilización.
- 15

El diseño del ensayo es básicamente el mismo que el ilustrado en la Fig. 4A, con las excepciones siguientes: los compuestos de unión (904), (906) y (908) están etiquetados con las etiquetas moleculares Pro10, Pro1 y Pro 2, respectivamente. El volumen total del ensayo es de 40 ul. El volumen del lisado se ajusta a 30 ul con la solución tampón de la lisis. Los anticuerpos se diluyen en la solución tampón de la lisis hasta 5 ul. Típicamente se emplean entre ~5000 y 15.000 equivalentes en células de lisados por reacción. El límite de detección es de ~1000 equivalentes en células de lisados. Procedimiento: Las concentraciones finales de los compuestos de unión antes de la mezcla (es decir, los conjugados de etiqueta molecular o biotina-anticuerpo) en la reacción:

- Pro10_anti-Her-1: 0,05-0,1 ug/ml
- Pro1_anti-Her-3: 0,1 ug/ml
- 25 Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,1 a 0,2 ug/ml
- Biotina_anti-Her-3: 1-2 ug/ml
- 1. Para someter a ensayo 96 pocillos, añadir 5 ul de mezcla del anticuerpo a 30 ul de lisado e incubar durante una hora en RT.
- 30 2. Añadir 5 ul de sonda de clivaje derivatizada de estreptavidina (final 4 ug/pocillo) para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 45 minutos.
- 3. Añadir 150 ul de PBS con BSA al 1% a la placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250) e incubar durante una hora en RT para bloquear.
- 4. Vaciar la placa de filtrado mediante succión por vacío. Transferir las reacciones del ensayo a la placa de filtrado y aplicar vacío para vaciar.
- 35 5. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
- 6. Añadir 200 ul de solución tampón de iluminación y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
- 7. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar durante 20 min.
- 8. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis, empleando un instrumento AB13100 CE con un capilar de 22 cm (condiciones de inyección: 5 kV, 70 seg, 30°C; condiciones de funcionamiento: 425 seg, 30°C).
- 40

Las soluciones tampón de ensayo son las siguientes:

Solución tampón de lisis (recién hecha y almacenada sobre hielo)

<u>Final</u>	ul	Reserva
1% Triton X-100	1000	10%

20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	500	1 M
100 mM NaCl	200	5M
50 mM NaF	500	1M
50 mM Na beta-glicerofosfato	500	1,0M
1 mM Na ₃ VO ₄	100	0,1 M
5 mM EDTA	100	0,5 M
10 ug/ml pepstatina	100	1 mg/ml
1 comprimido (por 10 ml) de inhibidor de proteasa Roche Complete (#1836170)	N/A	N/A
Agua	7 ml	N/A
	10 ml Total	

Solución tampón de lavado (almacenada a 4°C): 0,5% Triton X100 en lx PBS.

Solución tampón de iluminación:

<u>Final</u>	ul	Reserva
0,005x PBS	50	lx
CE std 1 (A27, ACLARA Biosciences, Inc., Mountain View, CA)	4	5000x
CE std 2 (fluoresceína)	4	5000x
Agua	9942	N/A
	10 ml Total	

Análisis de datos:

1. Normalizar la señal de unidades de fluorescencia relativa (RFU) de cada etiqueta molecular frente al estándar de referencia 2.
- 5 2. Sustraer las RFU del control de fondo «no lisado» de las correspondientes señales de las etiquetas moleculares.
3. Informar la heterodimerización para Her-1 como la ratiométrica de RFU correspondiente para RFU de Prol I_{anti}-Her-3 de los pocillos de ensayo utilizando biotina-anti-Her-3.
4. Informar la fosforilación del receptor para Her-1,2,3 como RFU de la ratiométrica de Pro2_PT100 anti-fosfo-Tir para RFU de Prol I_{anti}-Her-3 de los pocillos de ensayo empleando biotina-anti-Her-3 (datos no mostrados).
- 10 Las Figuras 9A y 9B muestran los incrementos de las cantidades de heterodímeros de Her1-Her3 sobre células 22Rv1 y A549, respectivamente, con el incremento de las concentraciones de EGF.

Ejemplo 6

Aparición de heterodímeros de IGF-1R con Her1, Her2, y Her3 en los lisados de tejido de mama tumoral

15 En este ejemplo, se sometieron a ensayo las células de 12 tejidos de mama tumorales humanos diferentes para determinar la presencia de dímeros de Her1-IGF-1R, Her2-IGF-1R, y Her3-IGF-1R, empleando básicamente los mismos ensayos que los ilustrados en la Fig. 4A. La preparación de la muestra se realizó como sigue:

1. Los tejidos congelados de manera instantánea son alterados mecánicamente en estado congelado por corte.
- 20 2. Transferir tejidos a un tubo micrófugo y añadir 3x volúmenes de tejido de solución tampón de lisis. A continuación, mezclar con agitador vortex para dispersar los tejidos en la solución tampón.

3. Incubar en hielo durante 30 min., agitando con vortex para mezclar.
4. Centrifugar a 14.000 rpm, 4°C, durante 20 min.
5. Recoger los supernatantes y lisados y determinar la concentración total de proteína con un ensayo BCA (Pierce) empleando una pequeña alícuota.
- 5 6. Dividir el resto en alícuotas para el almacenamiento a -80°C hasta el uso.

El ensayo se preparó como sigue:

1. El volumen total del ensayo es de 40 ul.
2. Los lisados se testan en series de titulación de 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,63, 0,31 ug de equivalentes totales y se ajusta el volumen a 30 ul con la solución tampón de lisis. Los datos de las series de titulación confirman la especificidad de la dimerización.
3. Se emplea una mezcla de anticuerpo universal que comprende todos los compuestos de unión y anticuerpo con biotina diluidos en una solución tampón de lisis, a las concentraciones que se indican a continuación.

Concentraciones finales de anticuerpos antes de la mezcla en las reacciones:

- Pro10_anti-Her-2: 0.1 ug/ml
- 15 Pro14_anti-Her-1: 0,1 ug/ml
- Prol 1_anti-Her-3: 0,1 ug/ml
- Pro7_anti-IGF-IR: 0,1 ug/ml
- Pro2_anti-fosfo-Tir: 0,2 ug/ml
- Biotina_anti-Her-2: 2 ug/ml

Procedimiento:

1. Para someter a ensayo 96 pocillos, añadir 5 ul de mezcla de reacción universal a 30 ul de lisado e incubar durante una hora en RT.
2. Añadir 5 ul de tijera molecular derivatizada de estreptavidina, es decir la sonda de clivaje (final 4 ug/pocillo), para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 45 minutos.
- 25 3. Añadir 150 ul de PBS con BSA al 1% a la placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250) e incubar durante una hora en RT para bloquear.
4. Vaciar la placa de filtrado mediante succión por vacío. Transferir las reacciones del ensayo a la placa de filtrado y aplicar vacío para vaciar.
5. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
- 30 6. Añadir 200 ul de solución tampón de iluminación y aplicar vacío para vaciar. Repetir una vez.
7. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar durante 20 min.
8. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis, empleando: (i) equipo CE: ABI3100, capilar de 22 cm, (ii) condiciones de inyección CE: 5 kV, 70 seg, 30°C, y (iii) condiciones de funcionamiento CE: 425 seg, 30°C

Análisis de datos:

1. Normalizar la señal de RFU de cada etiqueta molecular frente al estándar de referencia CE 1.
2. Buscar señales susceptibles de titulación para cada etiqueta molecular. Se entiende que las señales que no son susceptibles de titulación son señales no específicas y no se emplean para la interpretación de los datos. Se determina un valor de corte basándose en los valores de un conjunto amplio de tejidos normales en los que se espera que las señales de dimerización estén ausentes o se mantengan en los niveles mínimos. Estos valores también representan el nivel basal de dimerización sobre los tejidos normales con los que se comparan los tejidos tumorales.

40

3. Se notifica la heterodimerización para IGF-1R con Her-1 o Her-2 o Her-3 como las RFU específicas correspondientes.

5 Dos de los 12 tumores de mama sometidos a ensayo expresaban heterodímeros de Her1-IGF-1R, Her2-IGF-1R, y Her3-IGF-1R, tal como se muestra en las Fig. 10A-C. Las líneas de la gráfica de cada Figura muestran la tendencia entre la cantidad de heterodímero del receptor medida y la cantidad de lisado sometida a ensayo para las dos muestras de tumor de mama que obtuvieron resultados positivos para los heterodímeros indicados.

Ejemplo 7

Complejo de activación del receptor de P13K/Her-3

10 En este ejemplo, los ensayos se diseñaron como se muestra en las Fig. 11A y 11C para medir un complejo del receptor que comprende Her2, Her3, y PI3K en la línea de células del cáncer de mama, MCF-7. El compuesto de unión (1106) que tiene una primera etiqueta molecular («mT₁» en la Figura y «eTag1» debajo) es específico para el dominio extracelular del receptor Her3(1102); el compuesto de unión (1110) que tiene una segunda etiqueta molecular («mT₂» en la Figura y «eTag2» debajo) es específico para el componente p185 (1111) de la proteína PI3K (1100); y la sonda de clivaje (1108) que tiene un fotosensibilizador unido es específica para el dominio intracelular del receptor Her3 (1102), donde «H2» indica un receptor Her2 (1104), «H3» indica un receptor Her3 (1102), «p85» y «p110» son componentes de PI3-quinasa (1100), que se une a un sitio de fosforilación de H3 (denotado por «P») a través de su fracción p85. Los dos diseños del ensayo son similares, salvo porque en el diseño de la Fig. 11A la sonda de clivaje es específica para el receptor Her3 y en el diseño de la Fig. 11C la sonda de clivaje es específica para el componente p85 de PI3-quinasa. Los ensayos se realizaron como sigue:

20 Preparación de la muestra:

1. Cultivo de una línea de células de cáncer de mama privada de suero durante una noche, antes de la utilización.
2. Estimulación de las líneas de células con HRG en medios de cultivo durante 10 minutos a 37°C. Algunos ejemplos de dosis de HRG son 0, 0,032, 0,16, 0,8, 4, 20, 100 nM para las células MCF-7.
- 25 3. Aspiración de los medios de cultivo, transferencia a hielo y adición de la solución tampón de lisis (anteriormente descritos) para el lisado de las células *in situ*.
4. Raspado y transferencia del lisado al tubo micrófugo. Incubación en hielo durante 30 min. Micrófugo a 14.000 rpm, 4°C, durante 10 min.
- 30 5. Recopilación de supernatantes como lisados y división en alícuotas para el almacenamiento a -80°C hasta la utilización.

Solución tampón de lisis (recién hecha y almacenada sobre hielo):

Final	ul	Reserva
1% Triton X-100	1000	10%
20 mM Tris-HCl (pH 7.5)	200	1 M
100 mM NaCl	200	5 M
50 mM NaF	500	1 M
50 mM Na beta-glicerofosfato	1000	0,5 M
1 mM Na ₃ VO ₄	100	0,1 M
5 mM EDTA	100	0,5 M
10 ug/ml pepstatina	100	1 mg/ml
1 comprimido (por 10 ml) de inhibidor de proteasa Roche Complete (#1836170)	N/A	N/A
Agua	6500	N/A

 10 ml Total

Diseño del ensayo: La formación del complejo del receptor se cuantifica ratiométricamente basándose en los esquemas ilustrados en cada Figura. Es decir, la lectura de los ensayos son los ratios de los picos de las etiquetas moleculares, eTag2/eTag1.

- 5 El volumen total del ensayo es de 40 ul. El volumen del lisado se ajusta a 10 ul con la solución tampón de la lisis. Los anticuerpos se diluyen en la solución tampón de la lisis hasta 20 ul. Típicamente se emplean entre ~5000 y 500.000 equivalentes en células de lisados por reacción.

Procedimiento: Concentraciones operativas de los anticuerpos premezclados antes de añadirlos a la reacción: Para el complejo Her-3/PI3K con sonda de clivaje en Her-3 (el diseño de la Fig. 11 A)

- 10 eTag1_anti-Her-3 a 10 nM (eTag1 era Pro14 en este ensayo)

eTag2_anti-PI3K a 10 nM (eTag2 era Pro1 en este ensayo)

Biotina_anti-Her-3 a 20 nM

Estándar Universal US-1 a 700 nM

- 15 [El Estándar Universal US-1 es BSA conjugado con biotina y la etiqueta molecular Pro8, que se emplea para normalizar la cantidad de perlas fotosensibilizadoras de estreptavidina en un ensayo]. Las etiquetas moleculares se unieron directamente a los anticuerpos, haciendo reaccionar un éster NHS de un precursor de etiqueta molecular con aminas libres de los anticuerpos, empleando técnicas convencionales, véase por ejemplo Hermanson (anteriormente citado).

Para el complejo Her-3/PI3K con sonda de clivaje en PI3K (el diseño de la Fig. 11 C):

- 20 eTag1_anti-PI3K a 10 nM (eTag1 era Prol en este ensayo)

eTag2_anti-Her-3 a 10 nM (eTag2 era Pro 14 en este ensayo)

Biotina anti-PI3K a 20 nM

Estándar Universal US-1 a 700 nM

- 25 9. Para someter a ensayo una placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250), añadir 20 ul de mezcla de anticuerpo a 10 ul de lisado e incubar durante una hora a 4°C.

10. Añadir 10 ul de sonda de clivaje derivatizada de estreptavidina (final 4 ug/pocillo) para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 40 minutos.

11. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar.

12. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar.

- 30 13. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis.

Análisis de datos:

- 35 1. Normalizar la señal de unidades de fluorescencia relativa (RFU) de cada etiqueta molecular frente a la del Estándar Universal US-1 interno.
2. Sustraer las RFU del control de fondo «no lisado» de las correspondientes señales del indicador de eTag normalizadas.
3. Notificar la formación del complejo del receptor como la ratiométrica de la señal eTag2/eTag1 normalizada (como se muestra en las Fig. 1 IB y 1 ID).

Ejemplo 8

- 40 **Interacción del adaptador-receptor Shc/Her-3**

En este ejemplo, los ensayos se diseñaron como se muestra en las Fig. 12A y 12C. En la Fig. 12A, el receptor Her2 (1200) y el receptor Her3 (1202) forman un dímero en la membrana de superficie celular (1204) y cada receptor está representado como si tuviese sitios fosforilados (1209 y 1210). Las proteínas (1206 y 1208) se unen a los sitios de fosforilación (1210) y (1209), respectivamente. Un primer compuesto de unión (1214) y la sonda de clivaje (1216) son específicos para diferentes determinantes antigénicos del dominio extracelular del receptor Her 2 (1200). Un segundo compuesto de unión (1212) es específico para las proteínas Shc (1206 y 1208). Los diseños de los ensayos de las Fig. 12A y 12C son similares, salvo porque en el diseño de la Fig. 12A la sonda de clivaje es específica para el receptor Her2 y en el diseño de la Fig. 12C la sonda de clivaje es específica para el receptor Her3. Por tanto, en el primer caso, se mide el receptor Her2 total, mientras que en el segundo se mide el receptor Her3 total. Los ensayos se realizaron como sigue: la preparación de la muestra se realizó como anteriormente (Ejemplo 7).

Diseño del ensayo: La formación del complejo del receptor se cuantifica ratiométricamente basándose en los esquemas ilustrados en cada Figura. Es decir, en las Fig. 12B y 12D la lectura de los ensayos son los ratios de los picos de mT2/mTi como una función de la concentración de HRG.

El volumen total del ensayo es de 40 ul. El volumen del lisado se ajusta a 10 ul con la solución tampón de la lisis. Los anticuerpos se diluyen en la solución tampón de la lisis hasta 20 ul. Típicamente se emplean entre unos ~5000 y 500.000 equivalentes en células de lisados por reacción.

Procedimiento: Concentraciones operativas de los anticuerpos premezclados antes de añadirlos a la reacción:

Para el complejo Her-3/Shc con sonda de clivaje en Her-3 (el diseño de la Fig. 12B)

20

- eTag1_anti-Her-3 a 10 nM (eTag1 era Prol4 en este ensayo)
- eTag2_anti-Shc a 10 nM (eTag2 era Prol2 en este ensayo)
- eTag3_anti-fosfo-Tir a 10 nM (eTag3 era Pro2 en este ensayo)
- Biotina_anti-Her-3 a 20 nM

25

Estándar Universal US-1 a 700 nM

Para el complejo de Her-2/Shc con sonda de clivaje en Her-2 (el diseño de la Fig. 12A):

30

- eTag1_anti-Her-2 a 10 nM (eTag1 era Prol4 en este ensayo)
- eTag2_anti-Shc a 10 nM (eTag2 era Pro 12 en este ensayo)
- eTag3_anti-fosfo-Tir a 10 nM (eTag3 era Pro2 en este ensayo)
- Biotina_anti-Her-2 a 20 nM
- Estándar Universal US-1 a 700 nM

35

1. Para someter a ensayo una placa de filtrado de 96 pocillos (Millipore MAGVN2250), añadir 20 ul de mezcla de anticuerpo a 10 ul de lisado e incubar durante una hora a 4°C.
2. Añadir 10 ul de sonda de clivaje derivatizada de estreptavidina (final 4 ug/pocillo) para someter a ensayo el pocillo e incubar durante 40 minutos.
3. Añadir 200 ul de solución tampón de lavado y aplicar vacío para vaciar.
4. Añadir 30 ul de solución tampón de iluminación e iluminar.
5. Transferir 10 ul de cada reacción a la placa de ensayo CE para el análisis.

Análisis de datos:

40

1. Normalizar la señal de unidades de fluorescencia relativa (RFU) de cada etiqueta molecular frente a la del Estándar Universal US-1 interno.
2. Sustraer las RFU del control de fondo «no lisado» de las correspondientes señales para las etiquetas moleculares normalizadas.

3. Notificar la formación del complejo del receptor como la ratiométrica de las señales mT_2/mT_1 normalizadas (como se muestra en las Fig. 12B y 12D) y la fosforilación del receptor (datos no mostrados) como señales mT_3/mT_1 .

Ejemplo 9

5 **Correlación entre las mediciones del heterodímero de Her2-Her3 y las mediciones del complejo de Her3-PI3K en las muestras tumorales de mama**

En este ejemplo, las muestras tumorales de mama humanas se sometieron a ensayo por separado, empleando los métodos descritos anteriormente para determinar las cantidades de heterodímeros de Her2-Her3 y las cantidades del complejo de Her3-PI3K. La Fig. 13 ilustra los datos obtenidos de esos ensayos, que muestran que las dos mediciones están correlacionadas.

Ejemplo 10

Expresión de los heterodímeros de Her1-Her2 y Her2-Her3 en lisados de tejido tumoral de mama y lisados de tejido normal

Las muestras de tejido normal y las muestras de tejido tumoral de mama humanas congeladas se obtuvieron de la William Bainbridge Genomic Foundation (Bainbridge Island, WA). Los ensayos con un formato como el mostrado en la Fig. 3E se realizaron con 32 muestras de tejido tumoral y 30 muestras de tejido normal. Los tejidos tumorales se componían de una mezcla de células tumorales y normales que oscilaban entre un 25 y más de un 90 por ciento, de acuerdo con los datos patológicos suministrados con los tejidos por el distribuidor. Se prepararon las muestras y se realizaron los ensayos básicamente tal como se describe para los Ejemplos 2 y 6. Los datos se informan como la intensidad o el área del pico de la etiqueta molecular separada liberada del compuesto de unión específicamente unido al receptor opuesto a la sonda de clivaje, es decir la etiqueta molecular correspondiente a « mT_1 » en la Fig. 3E. No se hizo ningún intento de normalizar las señales generadas en función del porcentaje de células tumorales de la muestra.

Los datos de estas mediciones se muestran en la Fig. 14A (mediciones del heterodímero de Her1-Her2) y en la Fig. 14B (mediciones del heterodímero de Her2-Her3), donde los cuadrados blancos (\square) indican mediciones sobre tejidos tumorales y los diamantes negros (\blacklozenge) indican mediciones sobre tejidos normales. Los datos muestran que las células tumorales en fracciones importantes de las muestras de tejido tumoral expresan grandes cantidades de heterodímeros de Her1-Her2 y heterodímeros de Her2-Her3 en comparación con los expresados en las células de las muestras de tejido normal.

30 **Ejemplo 11**

Medición de los dímeros del receptor en las muestras de tejido embebidas en parafina y fijadas con formalina

En este ejemplo, los modelos de tejidos fijados hechos de líneas de células peletizadas se sometieron a ensayo para detectar la presencia de dímeros del receptor Her. El diseño del ensayo para los heterodímeros era básicamente el mismo que el que se describe en la Fig. 4A, con las excepciones que se indican a continuación. Es decir, se emplean cuatro componentes: (i) una sonda de clivaje que comprende un anticuerpo monoclonal biotinilado conjugado con una fracción inductora del clivaje (en este ejemplo, una estreptavidina derivatizada del fotosensibilizador, tal y como se ilustra en la Fig. 3E) y específica para uno de los receptores del dímero, (ii) un anticuerpo monoclonal derivatizado con una primera etiqueta molecular y específico para el mismo receptor que la sonda de clivaje, (iii) un anticuerpo monoclonal derivatizado con una segunda etiqueta molecular y específico para el receptor opuesto a aquel para el que es específica la sonda de clivaje, y (iv) un anticuerpo monoclonal derivatizado con una tercera etiqueta molecular y específico para una tirosina fosforilada intracelular. El diseño del ensayo para los homodímeros era básicamente el mismo que el que se describe en la Fig. 1D, con las excepciones que se indican a continuación.

En cada caso, los modelos de tejidos fijados se prepararon como sigue: las células cultivadas en placas de cultivo fueron estimuladas con EGF o HRG, tal y como se describe en los anteriores ejemplos. A continuación, fueron lavadas y retiradas mediante raspado. Las células retiradas fueron centrifugadas para formar una perla, después de lo cual se añadió formalina y la mezcla se incubó hasta el día siguiente a 4°C. La perla fijada fue embebida en parafina, utilizando un Miles Tissue Tek HI Embedding Center, después de lo cual se cortaron secciones de tejido de 10 μ m de la perla utilizando un micrótopo (Leica modelo 2145). Las secciones de tejido se colocaron en portaobjetos de vidrio de carga positiva para microscopios (habitualmente múltiples secciones de tejido por portaobjetos) y se hornearon durante una hora a 60°C.

Las secciones de tejido de los portaobjetos se sometieron a ensayo como sigue: Las secciones de tejido de un portaobjetos fueron desparafinadas con el reactivo EZ-Dewax (Biogenex, San Ramon, CA) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Dicho brevemente, se añadieron 500 μ L de EZ-Dewax a cada sección de tejido y las secciones fueron incubadas a RT durante cinco minutos, después de lo cual se lavaron con EtOH al 70%. Este paso se repitió y el portaobjetos se enjuagó finalmente con agua desionizada, después de lo cual el portaobjetos fue incubado en agua en RT durante 20 min. El portaobjetos se sumergió a continuación en una solución 1X Antigen Retrieval (Biogenesis, Brentwood, NH) a pH 10, después de lo cual fue calentado durante 15 minutos en un horno microondas (5 min a máxima potencia, seguidos de 10 minutos a baja potencia). Después de enfriar en RT (unos 45 minutos), el portaobjetos se sumergió en un baño de agua durante 5 minutos y después se secó. Las secciones de tejido sobre el portaobjetos seco se rodearon con un rotulador de cera hidrófoba para crear regiones capaces de contener reactivos colocados sobre las secciones de tejido (tal y como se ilustra en las Fig. 1H-1I), después de lo cual se lavó el portaobjetos tres veces en IX Perm/Wash (BD Biosciences). Se añadieron a cada sección 50-100 μ L de solución tampón de bloqueo y el portaobjetos se colocó en una caja humidificada cubierta que contenía agua desionizada durante dos horas a 4°C. A continuación, se retiró la solución tampón de bloqueo de cada sección mediante succión. (La solución tampón de bloqueo es IX Perm/Wash con inhibidores de proteasa (Roche), inhibidores de fosfatasa (fluoruro de sodio, vanadato de sodio, (3-glicerol fosfato), y 10% de suero de ratón). Se añadieron a cada sección 40-50 μ L de la mezcla de anticuerpos que contenía compuestos de unión y la sonda de clivaje (5 μ g/mL cada uno, salvo por la biotina-Ab5 (anti-Her1) a 10 μ g/mL en el ensayo de Her1-Her2), y se colocó el portaobjetos en una caja humidificada hasta el día siguiente a 4°C. A continuación, se lavaron las secciones tres veces con 100 μ L Perm/Wash que contenía inhibidores de fosfatasa y proteasa, después de lo cual se añadieron 50 μ L de fotosensibilizador en solución IX Perm/Wash (que contenía inhibidores de fosfatasa y proteasa). El portaobjetos fue incubado entonces durante una hora u hora y media a 4°C en la oscuridad en una caja humidificada, después de lo cual se retiró el fotosensibilizador por succión, manteniendo el portaobjetos en la oscuridad. Mientras se mantenía en la oscuridad, el portaobjetos se sumergió después en .01X PBS y se incubó sobre hielo durante una hora. Se retiró el portaobjetos del PBS, se secó y se añadieron a cada sección 40-50 μ L de 0.01X PBS con 2 pM de fluoresceína, después de lo cual se iluminó con un diodo láser de alta potencia (emisor GaAlAs JJR, modelo OD-880W, OPTO DIODE CORP, Newbury Park, CA) durante una hora. La fluoresceína actúa como un estándar para ayudar a correlacionar los picos de un electroferograma con las etiquetas moleculares. Después de la iluminación, la solución que cubría cada sección de tejido se mezcló agitando suavemente y se transfirió a una placa CE para el análisis en un instrumento de electroforesis por capilaridad de Applied Biosystems (Foster City, CA) modelo 3100.

La Fig. 15A muestra los datos del análisis de los homodímeros de Her1-Her1 y la fosforilación del receptor en secciones de las perlas fijadas de la línea de células de adenocarcinoma de mama, MDA-MB-468 (nº de acceso ATCC: HTB-132), preparadas a partir de células no estimuladas o bien de células estimuladas con 100 μ M de EGF. El anticuerpo monoclonal anti-Her1 biotinilado (Labvision) a 2 μ g/mL se empleó como anticuerpo primario de la sonda de clivaje (para el clivaje de la estreptavidina derivatizada de azul de metileno (anteriormente descrita) se unió a través de la biotina). El anticuerpo monoclonal anti-Her1 derivatizado de Pro10 (Labvision) a 2 μ g/mL se empleó para medir el Her1 homodimerizado. El anticuerpo monoclonal anti-Her1 derivatizado de Pro1 (Labvision) a 0,8 μ g/mL se empleó para medir el Her1 total. El anticuerpo no etiquetado Ab-5 también fue incluido en las reacciones a 3,2 μ g/mL. El anticuerpo monoclonal derivatizado de Pro2 (anti-fosforilado-Tir, Cell Signaling) a 0,5 μ g/mL se empleó para medir la fosforilación intracelular. Los datos de las mediciones del tejido fijado confirman y son coherentes con las mediciones sobre lisados celulares, que muestran incrementos en la expresión del homodímero de Her—Her1 y fosforilación intracelular debido a la estimulación del EGF.

La Fig. 15B muestra los datos del análisis de los homodímeros de Her2-Her2 y de la fosforilación del receptor en secciones de perlas fijadas de las líneas de células de cáncer de mama MCF-7 y SKBR-3. Todos los anticuerpos monoclonales empleados como sondas de clivaje o compuestos de unión se emplearon a concentraciones de 5 μ g/mL. A fin de generar un mejor clivaje, en este ensayo se emplearon dos sondas de clivaje: una dirigida hacia un determinante antigénico extracelular de Her2 y la otra dirigida hacia un determinante antigénico intracelular de Her2. Los datos de las mediciones del tejido fijado confirman que las células SKBR3 expresan unos niveles superiores de homodímeros de Her2-Her2 que las células MCF-7.

La Fig. 15C muestra los datos del análisis de los heterodímeros de Her1-Her2 y la fosforilación del receptor en secciones de las perlas fijadas de la línea de células de adenocarcinoma de mama, MCF-7, preparadas a partir de células no estimuladas o bien de células estimuladas con 40 nM de EGF. Se utilizaron dos sondas de clivaje: una que comprendía el anticuerpo monoclonal anti-Her1 (a 5 μ g/mL) y la otra que comprendía el anticuerpo monoclonal (a 10 μ g/mL) (ambos de Lab vision), a fin de incrementar la velocidad de liberación de las etiquetas moleculares. Los datos muestran que los incrementos de la expresión del heterodímero de Her1-Her2 provocados por la estimulación con EGF se detectan en el tejido fijado.

La Fig. 15D muestra los datos del análisis de los heterodímeros de Her1-Her2 y la fosforilación del receptor en secciones de las perlas fijadas de la línea de células de adenocarcinoma de mama, 22Rv1, preparadas a partir de células no estimuladas o bien de células estimuladas con 100 nM de EGF. Una vez más, las mediciones sobre

tejidos fijados demuestran una regulación al alza de los dímeros de Her1-Her2 y la fosforilación del receptor Her, en respuesta al tratamiento con EGF.

- 5 La Fig. 15E muestra los datos del análisis de los heterodímeros de Her2-Her3 y la fosforilación del receptor en secciones de las perlas fijadas de la línea de células de adenocarcinoma de mama, MCF-7, preparadas a partir de células no estimuladas o bien de células estimuladas con 40 μ M de HRG. En este ejemplo, las reacciones de unión y las reacciones de clivaje tuvieron lugar en tubos que contenían secciones, en lugar de portaobjetos para microscopio. Por lo demás, el protocolo fue básicamente el mismo que el empleado para la detección de dímeros de Her1-Her2. Los datos muestran que los incrementos de la expresión del heterodímero de Her2-Her3 provocados por la estimulación con HRG se detectan en el tejido fijado.
- 10 La Figura 15F muestra los datos del análisis de los heterodímeros de Her2-Her3 y los dímeros de PI3K-Her3 en secciones de perlas fijadas de células MCF-7, tanto no estimuladas como estimuladas con 40 μ M de HRG. El diseño del ensayo para PI3K-Her3 fue básicamente como el que se describe en la Fig. 11A. El protocolo de fijación anterior se siguió en ambos casos, salvo porque ninguna de las muestras fue tratada con reactivos para la recuperación de antígeno. Los datos muestran que los dímeros de Her2-Her3 aumentaron con el tratamiento con HRG, pero que la cantidad del dímero de PI3K-Her3 se mantuvo básicamente sin cambios.
- 15 La Fig 15G muestra los datos del análisis de PI3K total, el dímero de Her2-Her3 total, y Her3 total, todos ellos con respecto a la cantidad de tubulina. La tubulina se midió en un ensayo tipo sándwich convencional, empleando una sonda de clivaje y un compuesto de unión con una etiqueta molecular. La tubulina se midió para testar procedimientos para normalizar la medición del dímero con respecto a una diana representativa del número de células total de una muestra, lo que puede resultar necesario para las mediciones sobre muestras con tipos de células heterogéneos. Los datos muestran que los ratios de PI3K-Her3 y Her2-Her3 con respecto a la tubulina son cualitativamente los mismos que en las mediciones realizadas directamente sobre PI3K-Her3 y Her2-Her3.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el estado de cáncer de un paciente que sufre un cáncer caracterizado por una expresión aberrante de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB, comprendiendo el método los pasos siguientes:
- 5 medir directamente en una muestra del paciente una cantidad de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB;
- comparar la cantidad de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB con la correspondiente cantidad de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB en una muestra de referencia; y
- 10 correlacionar las diferencias en la cantidad de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB de la muestra del paciente y la respectiva cantidad correspondiente de uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB de la muestra de referencia para determinar el estado de cáncer del paciente,
- donde el complejo o los complejos de receptores de superficie celular ErbB se seleccionan del grupo compuesto por homodímeros de Her1-Her1, homodímeros de Her2-Her2, dímeros del receptor Her1-Her3, dímeros del receptor Her1-Her4, dímeros del receptor Her2-Her4, dímeros del receptor Her3-Her4, homodímeros del receptor Her4-Her4,
- 15 complejos de Her1-PI3K, complejos de Her2-PI3K, complejos de Her3-PI3K, complejos de Her1-SHC, complejos de Her2-SHC, complejos de Her3-SHC, dímeros del receptor Her1-IGF-IR, dímeros del receptor Her2-IGF-IR, dímeros del receptor Her3-IGF-IR, dímeros del receptor Her1-PDGFR, dímeros del receptor Her2-PDGFR, dímeros del receptor Her3-PDGFR, dímeros del receptor p95Her2-Her3, dímeros del receptor p95Her2-Her2, dímeros del receptor p95Her2-Her1, dímeros del receptor EGFRvIII-Her1, dímeros del receptor EGFRvIII-Her2, y dímeros del receptor EGFRvIII-Her3;
- 20 en donde el complejo o los complejos de receptores de superficie celular ErbB se miden a través de los pasos siguientes:
- proporcionar para cada uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB un par de reactivos que comprenden una sonda de clivaje que tiene una fracción inductora del clivaje con una proximidad efectiva, y uno o
- 25 más compuestos de unión que tienen, cada uno de ellos, una o más etiquetas moleculares unidas a través de un enlace clivable, teniendo las etiquetas moleculares de los diferentes compuestos de unión características de separación distintas;
- mezclar la sonda de clivaje y el compuesto o los compuestos de unión para el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB con la muestra del paciente, de forma que la sonda de clivaje y el uno o más compuestos
- 30 de unión se unan específicamente a sus respectivos complejos de receptores de superficie celular ErbB y que los enlaces clivables de uno o más compuestos de unión se encuentren dentro de la proximidad efectiva de la fracción inductora del clivaje para que las etiquetas moleculares sean liberadas; y
- separar e identificar las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia o la cantidad del uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB en la muestra de dicho paciente.
- 35 2. El método conforme a la reivindicación 1, en donde el estado de cáncer del paciente es el grado de respuesta de dicho paciente al tratamiento con un fármaco que actúa sobre el dímero de ErbB.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, el cáncer de ovario, el cáncer de próstata y el cáncer colorrectal.
- 40 4. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son uno o más heterodímeros que incluyen un receptor PDGF.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB se seleccionan del grupo que consiste en dímeros del receptor Her1-PDGFR, dímeros del receptor Her2-PDGFR, y dímeros del receptor Her3-PDGFR.
- 45 6. El método de la reivindicación 1 o 5, en donde dicha muestra del paciente es una muestra de tejido fijada o una muestra de tejido congelada.
7. El método de la reivindicación 4, 5 o 6, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, el cáncer de ovario y el glioblastoma.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra del paciente es una muestra de tejido fijado y en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son Her1-Her1, Her1-Her3, Her1-Her4, Her2-Her2, Her3-Her4, o Her4-Her4.
- 50

9. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra del paciente es una muestra de tejido fijado y en donde el un o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son p95Her2-Her1, p95Her2-Her2, o p95Her2-Her3.
10. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son Her1-Her1, Her2-Her2 o Her1-Her3.
- 5 11. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son Her1-IGF-1R, Her2-IGF-1R o Her3-IGF-1R.
12. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son Her3-PI3K.
- 10 13. El método de la reivindicación 1, en donde el uno o más complejos de receptores de superficie celular ErbB son Her2-SHC o Her3-SHC.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la determinación del estado de cáncer del paciente incluye la predicción de la efectividad del paciente con respecto al tratamiento con un fármaco que actúa sobre el dímero de ErbB.

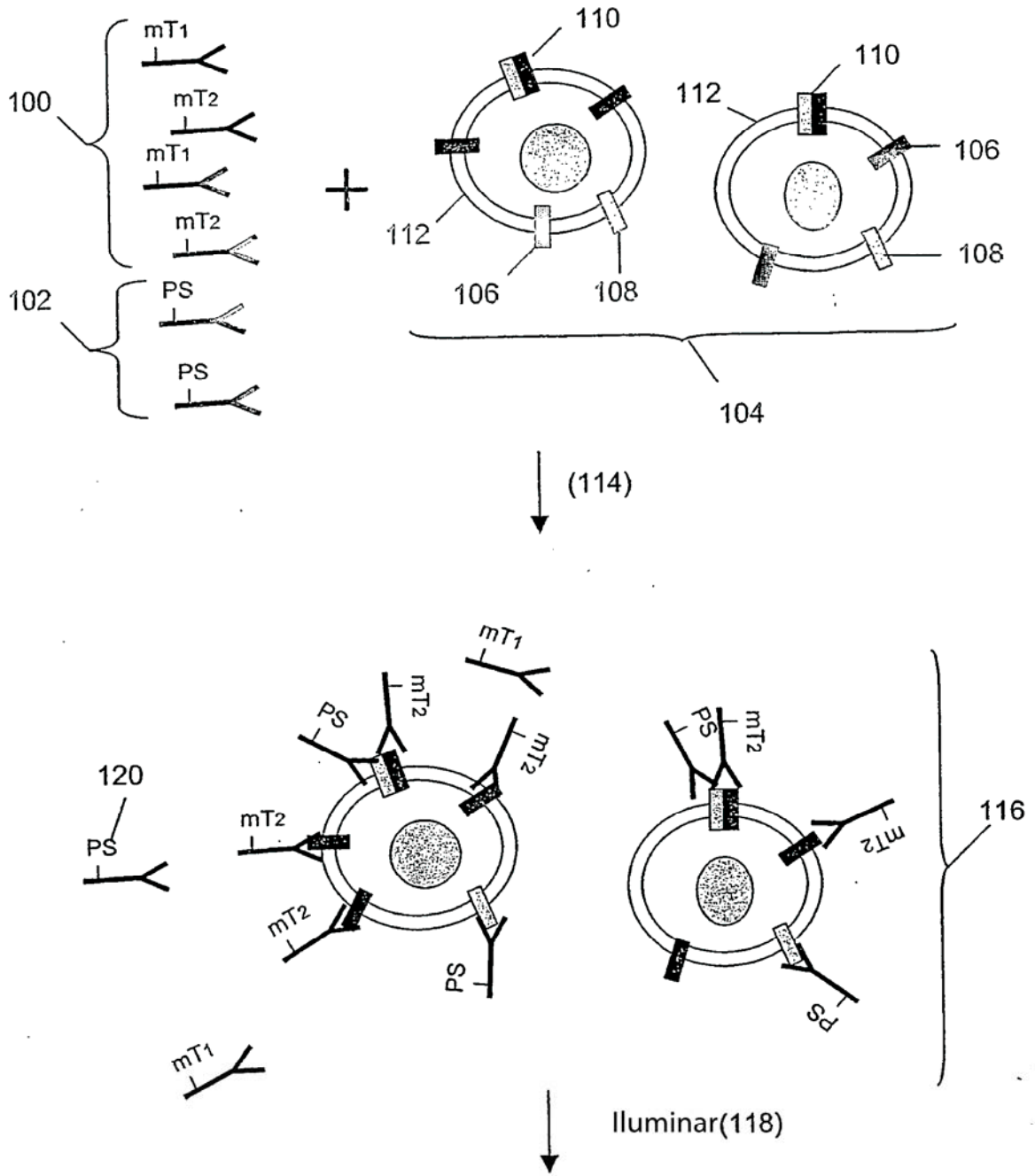


Fig. 1A

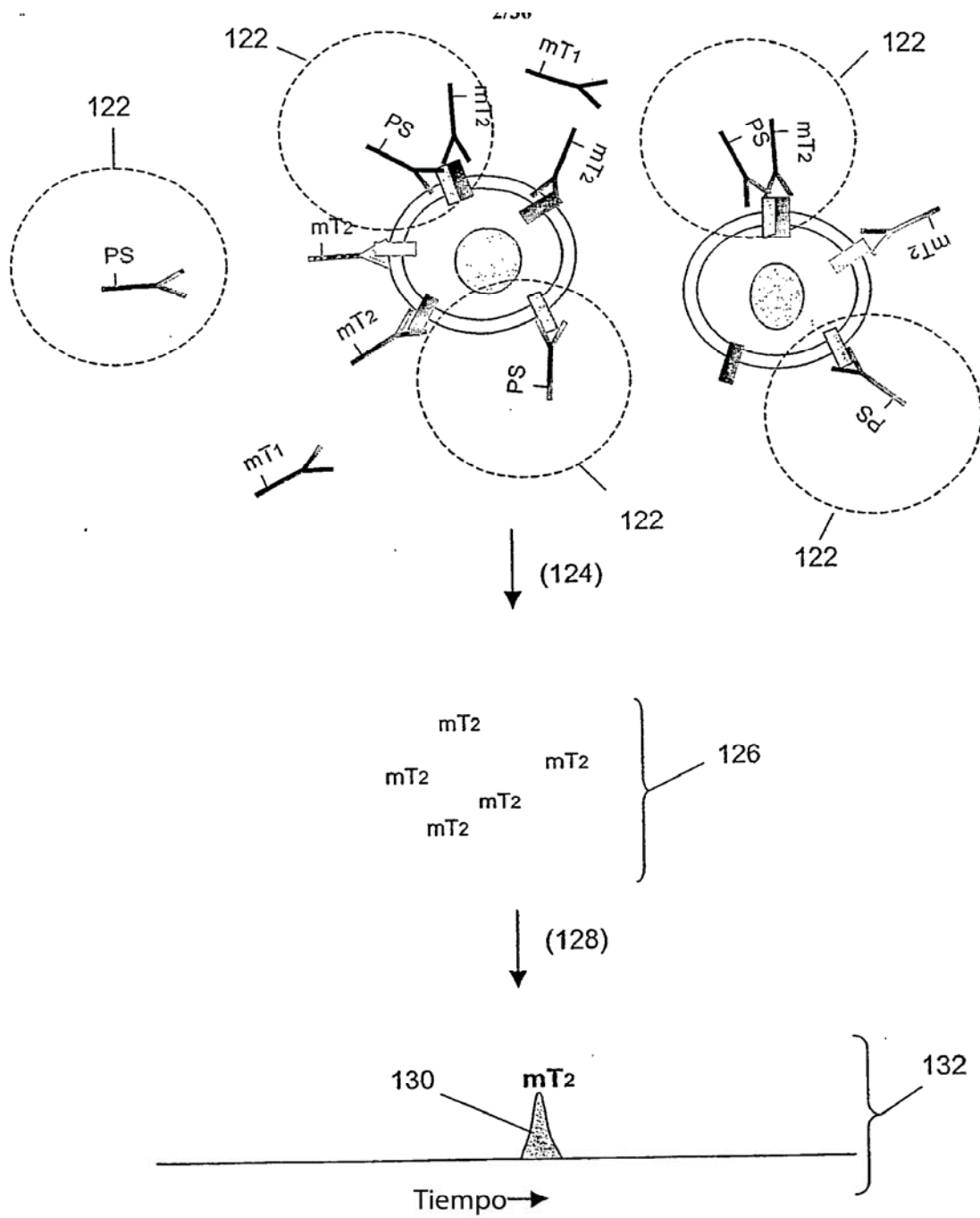


Fig. 1B

Medición de los dímeros de receptores de superficie celular

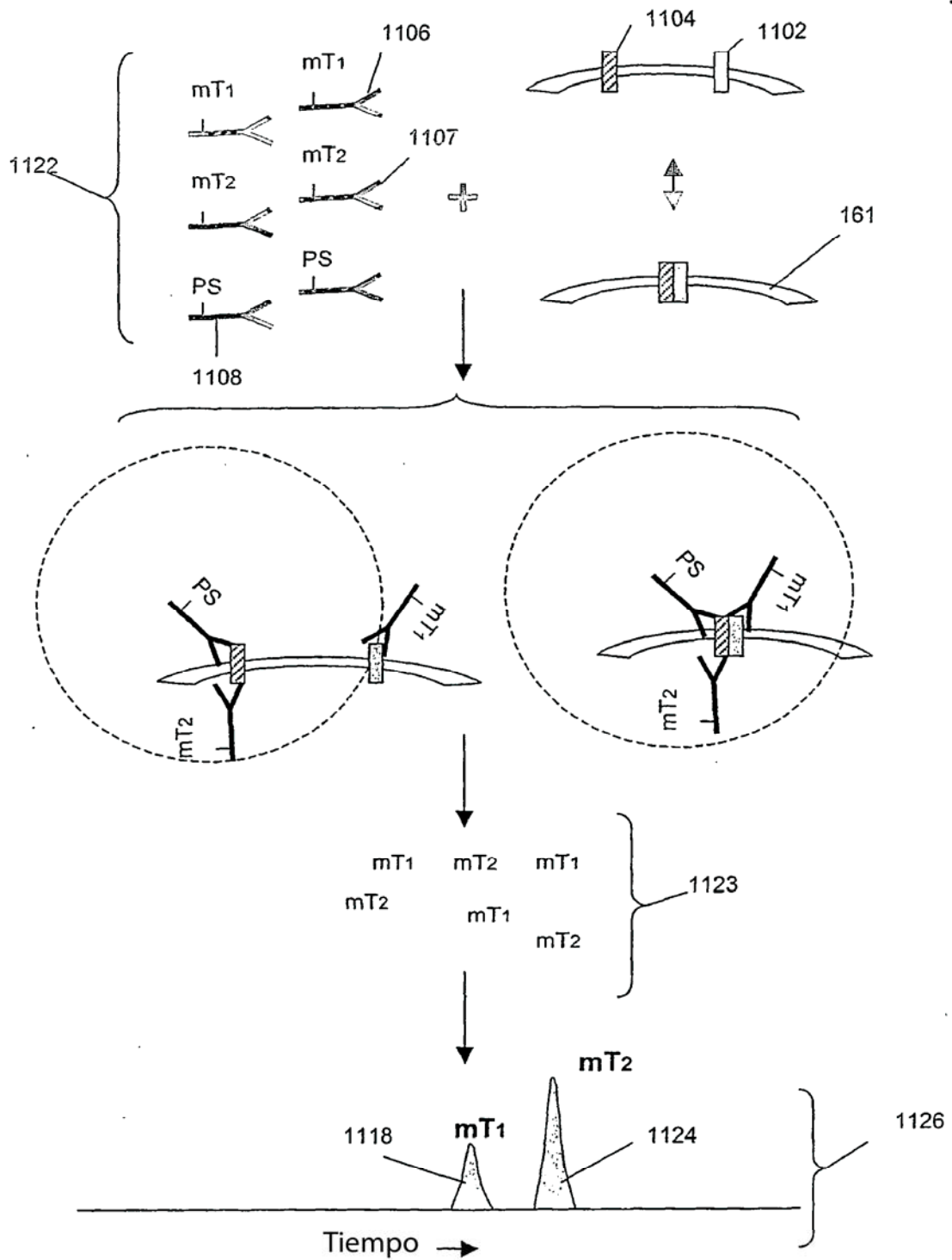


Fig. 1C

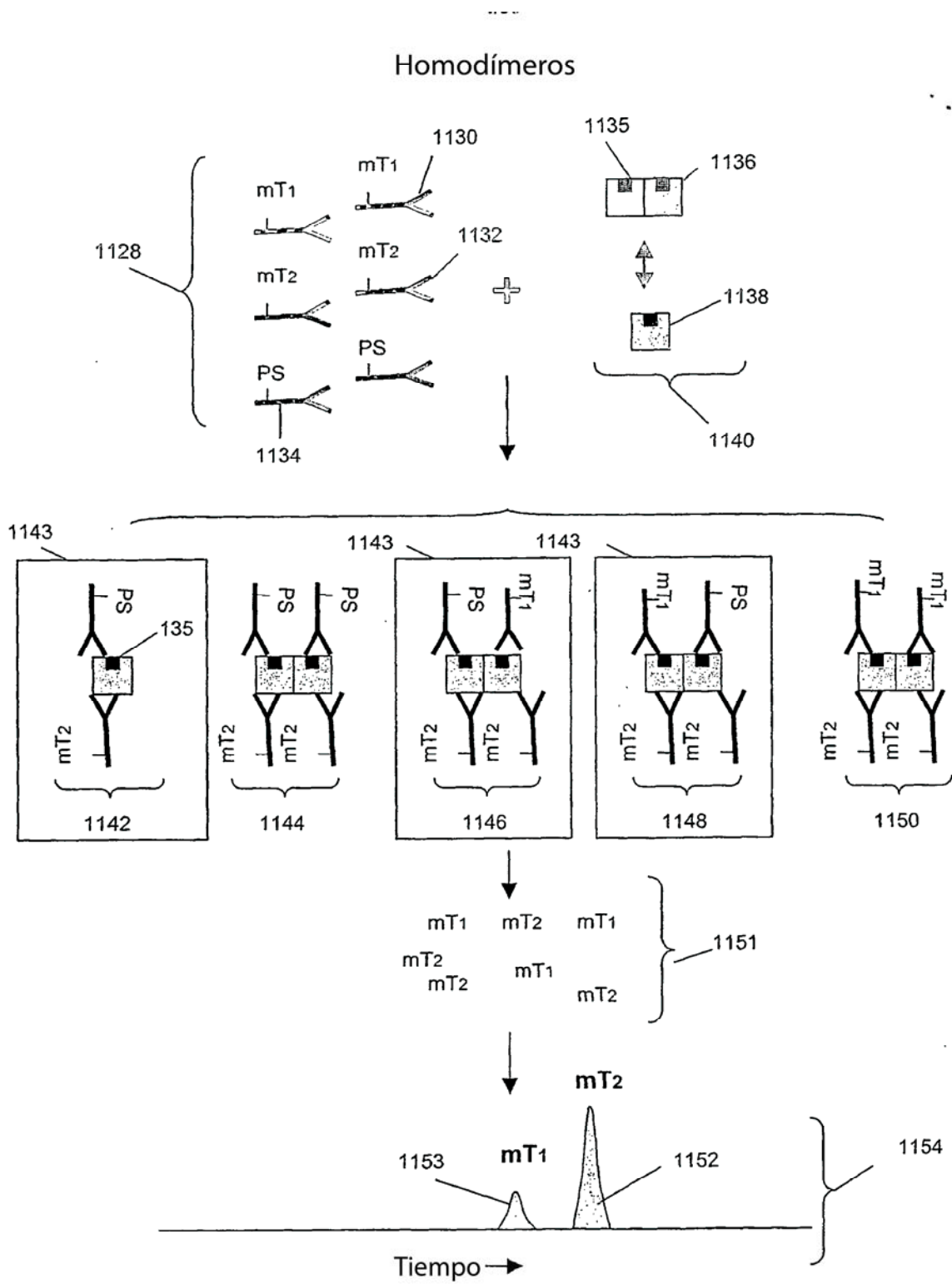


Fig. 1D

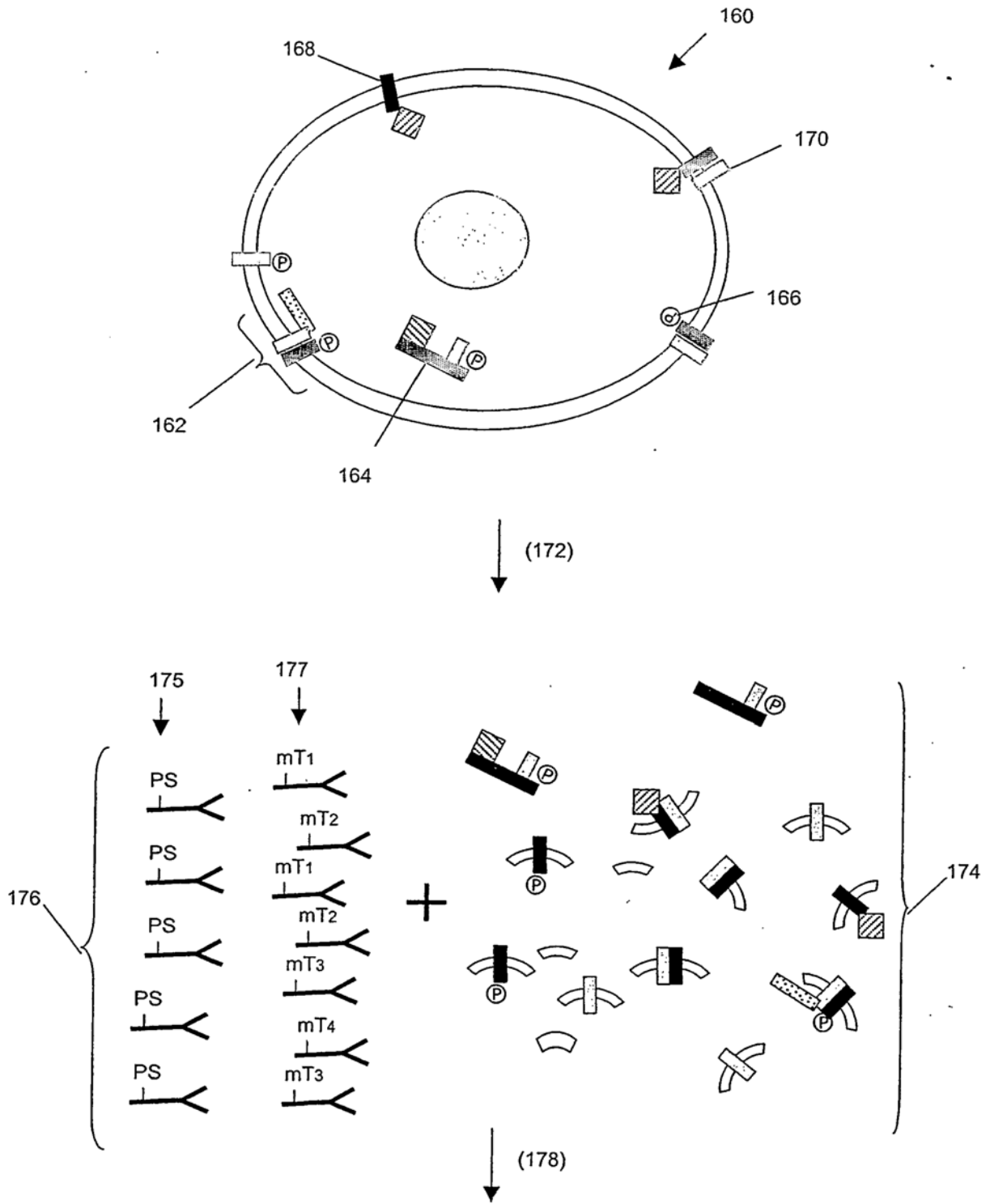


Fig. 1E

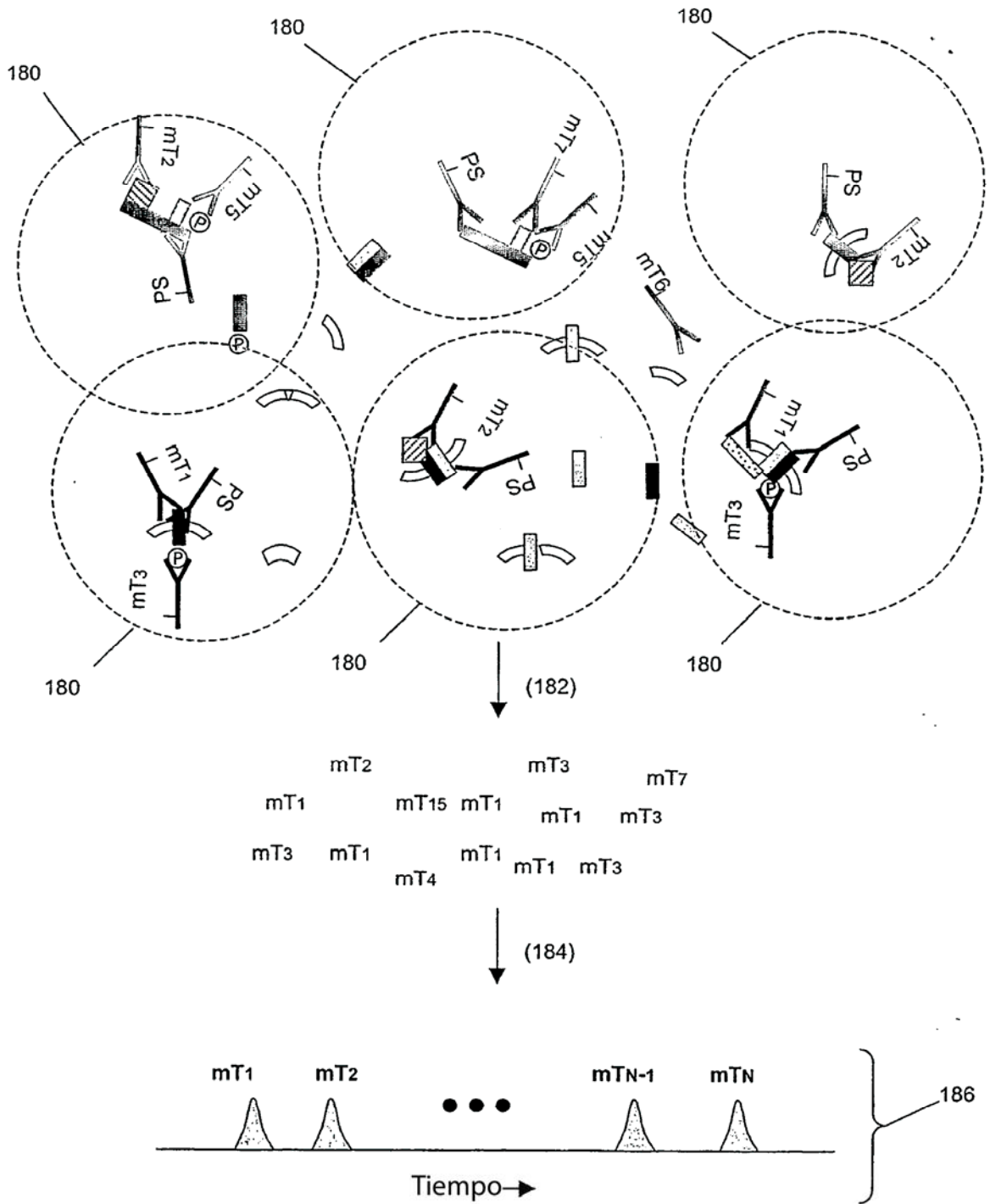


Fig. 1F

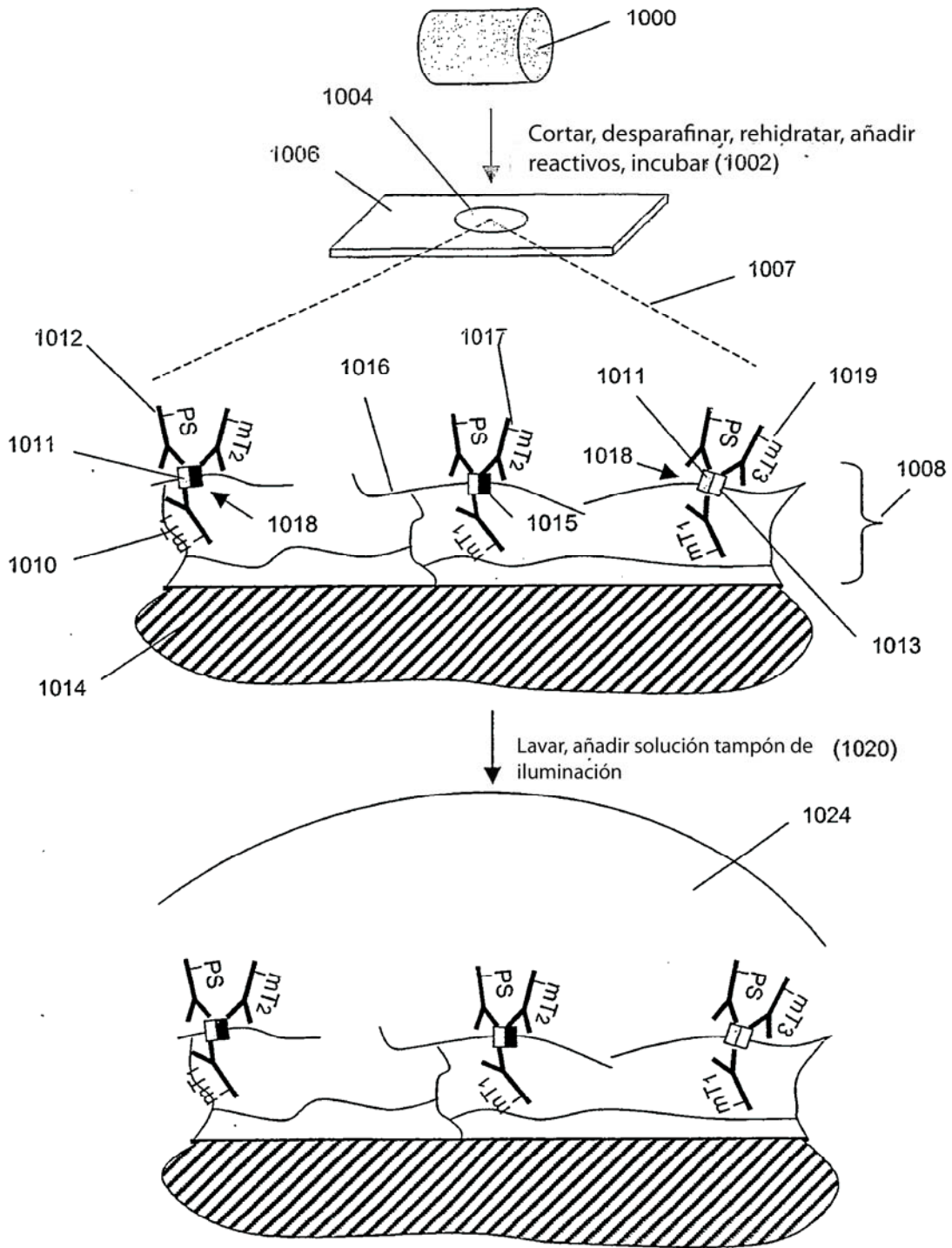


Fig. 1G

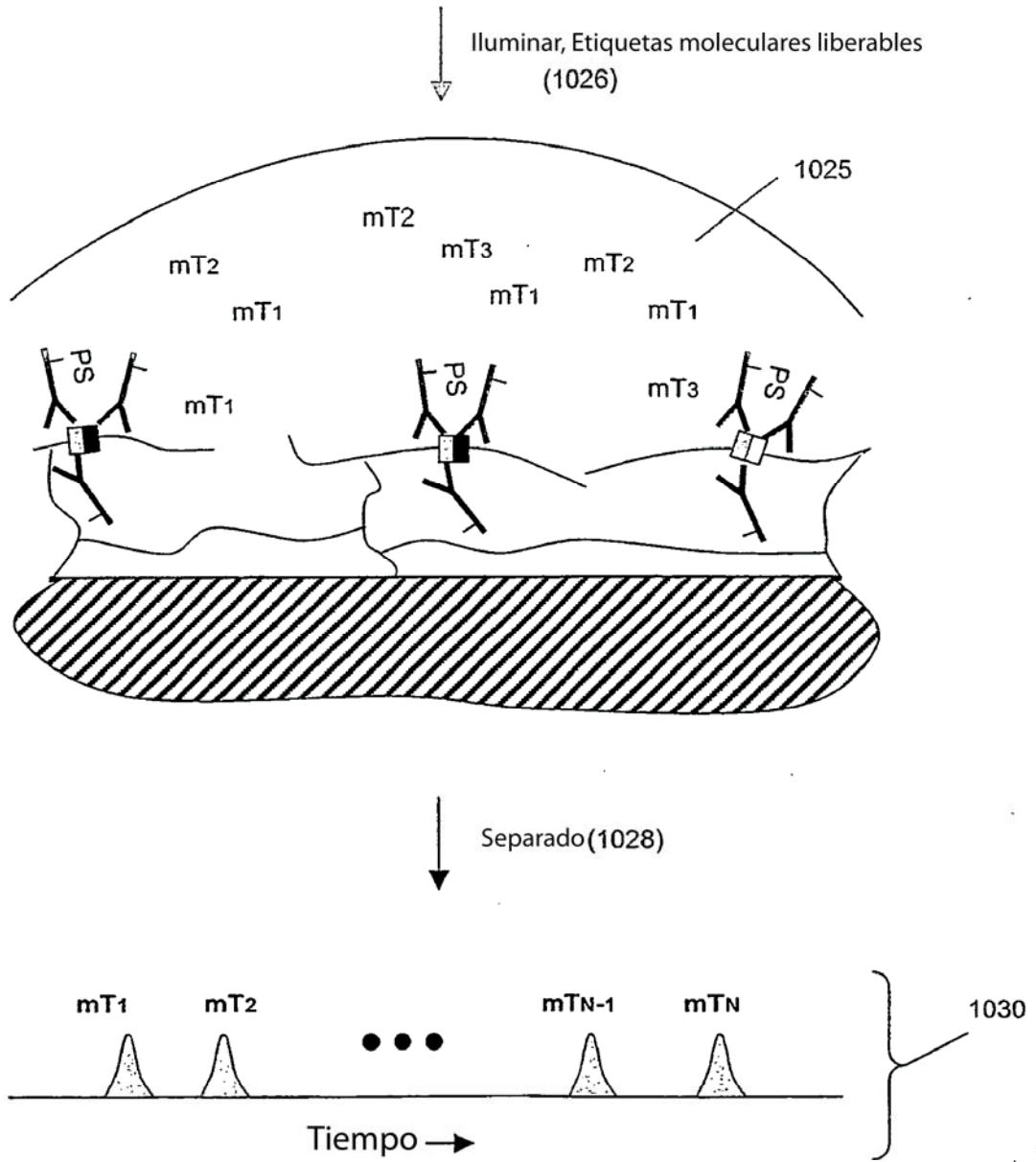


Fig. 1H

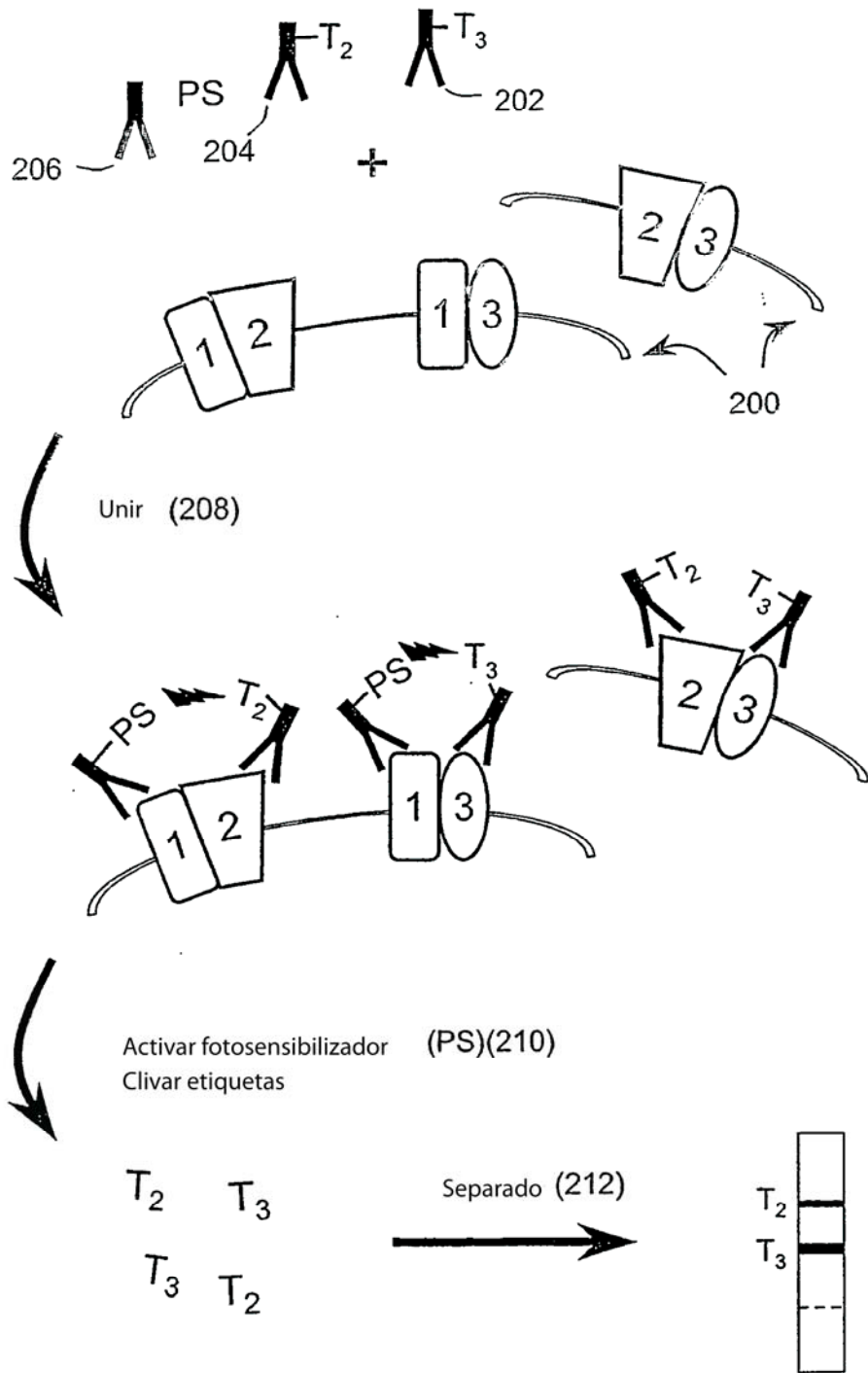


Fig. 2A

Ensayo	Anticuerpo de receptor específico			Membrana
	1	2	3	
I	PS	T ₂	T ₃	+
II	---	T ₂	T ₃	+
III	PS	---	T ₃	+
IV	PS	T ₂	---	+
V	PS	T ₂	---	-

Fig. 2B

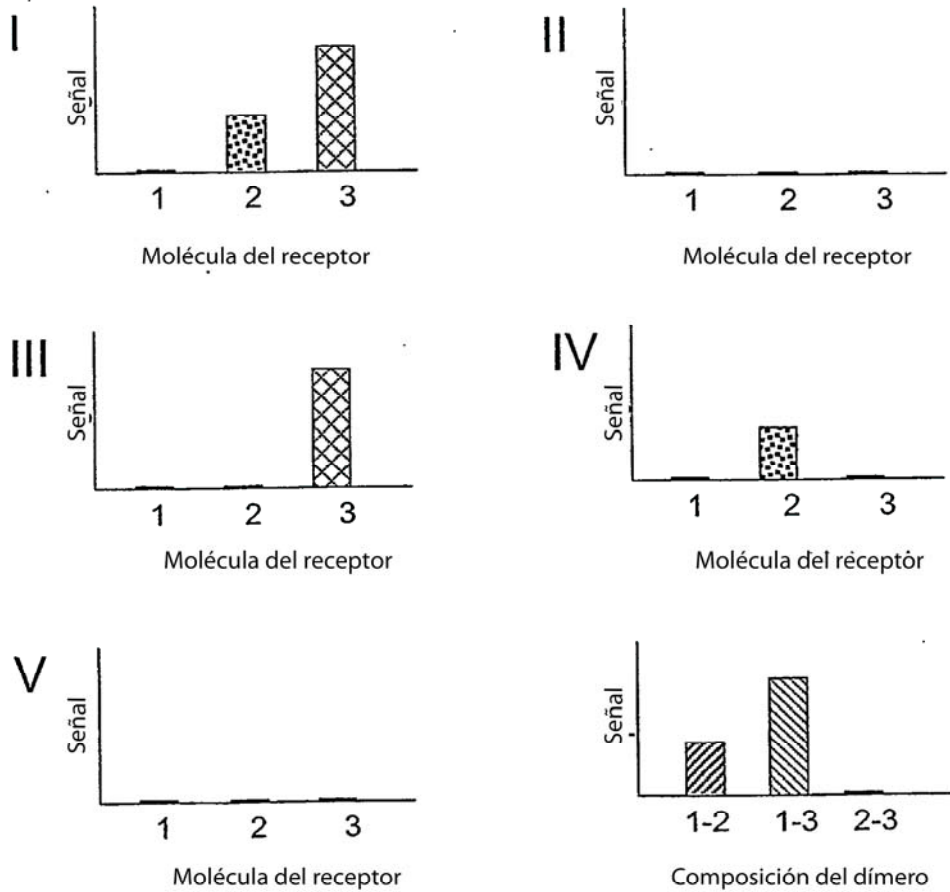


Fig. 2C

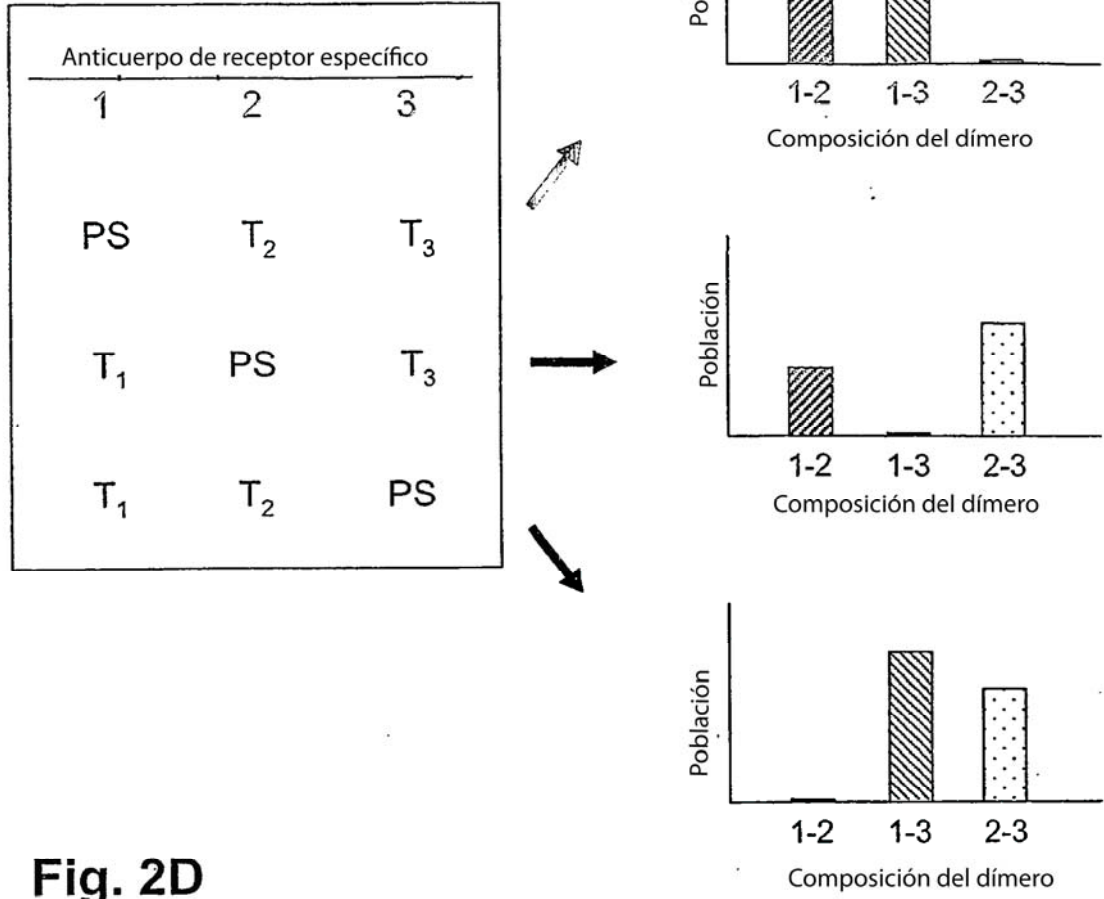


Fig. 2D

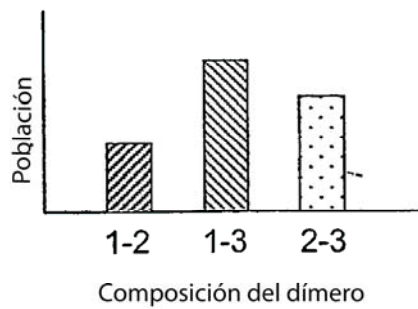


Fig. 2E

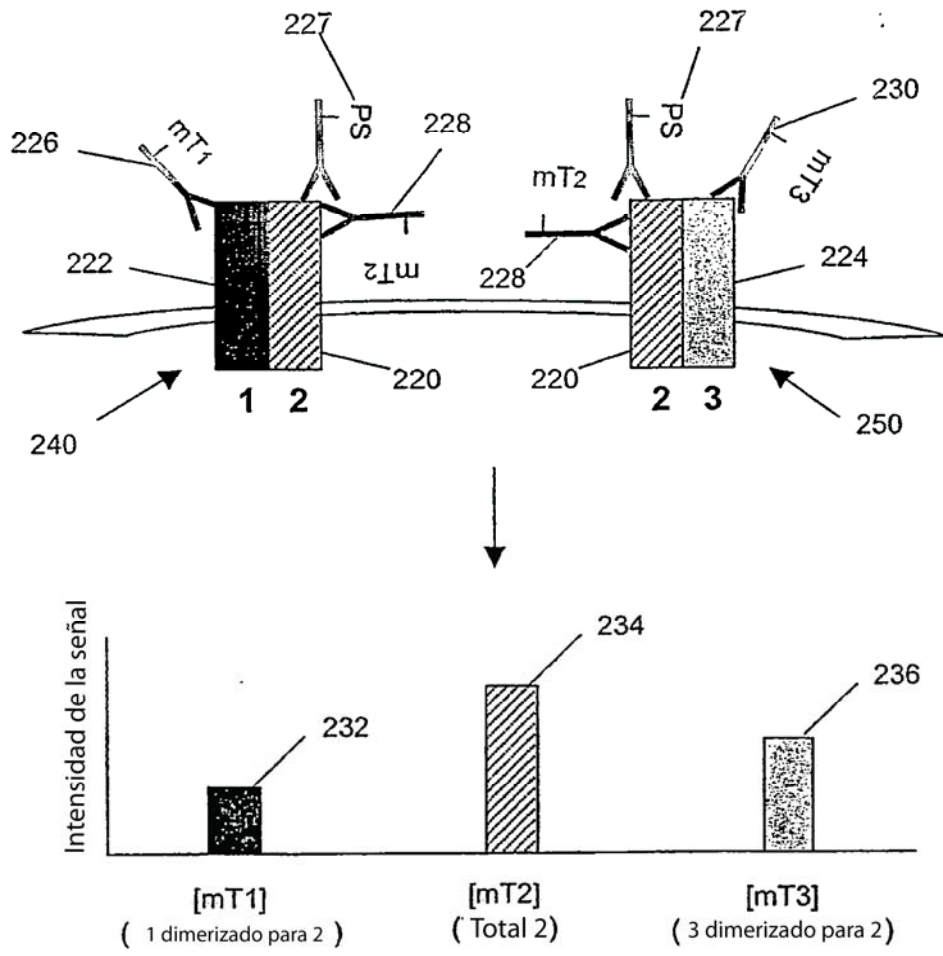


Fig. 2F

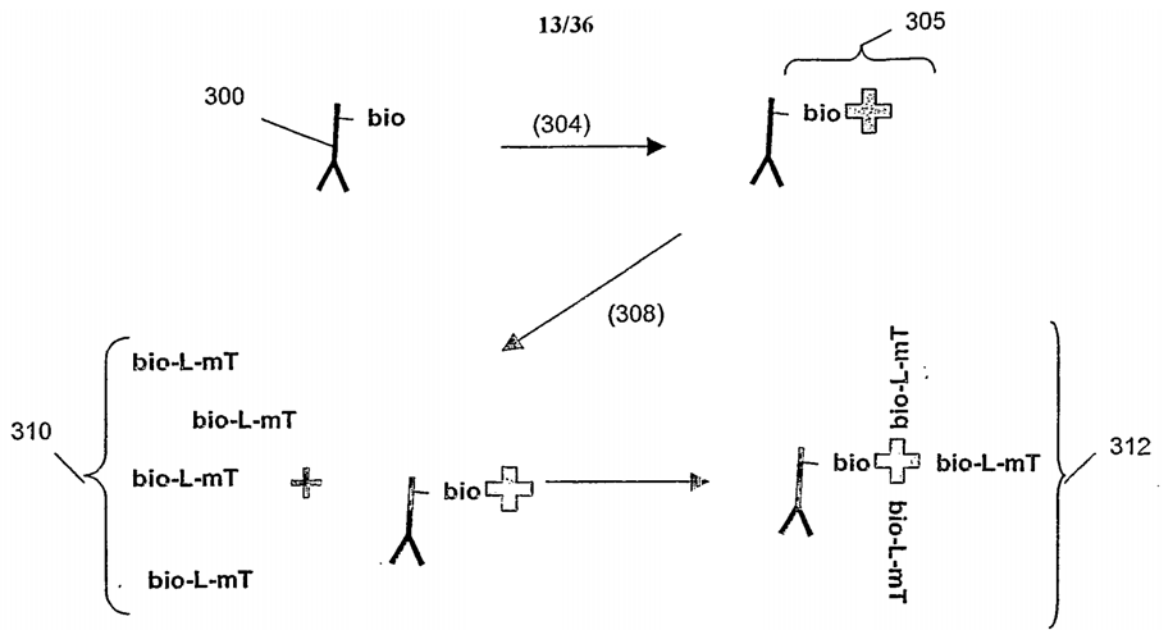


Fig. 3A

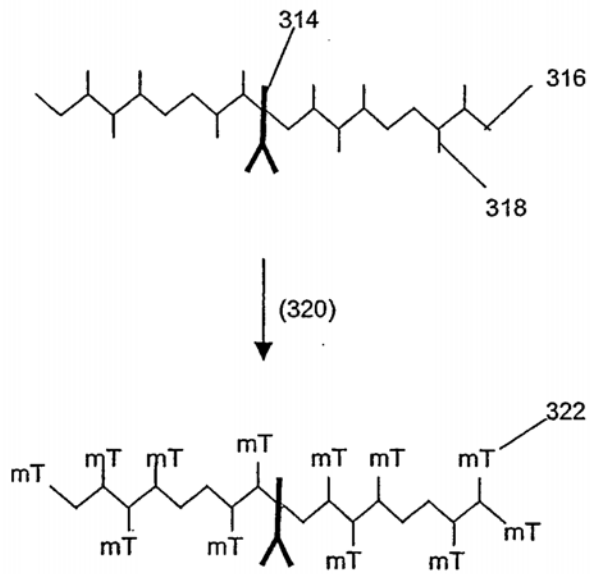


Fig. 3B

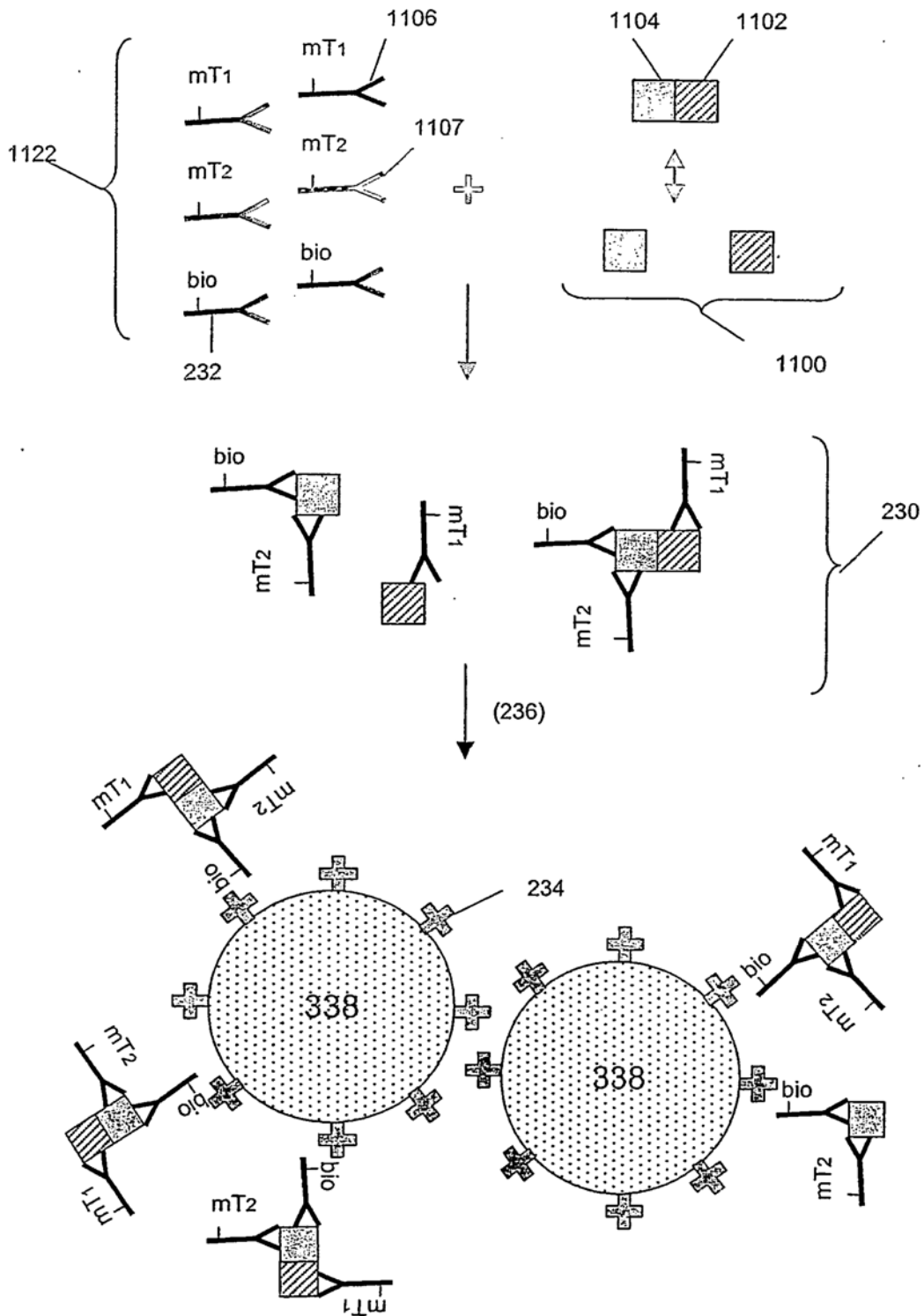


Fig. 3C

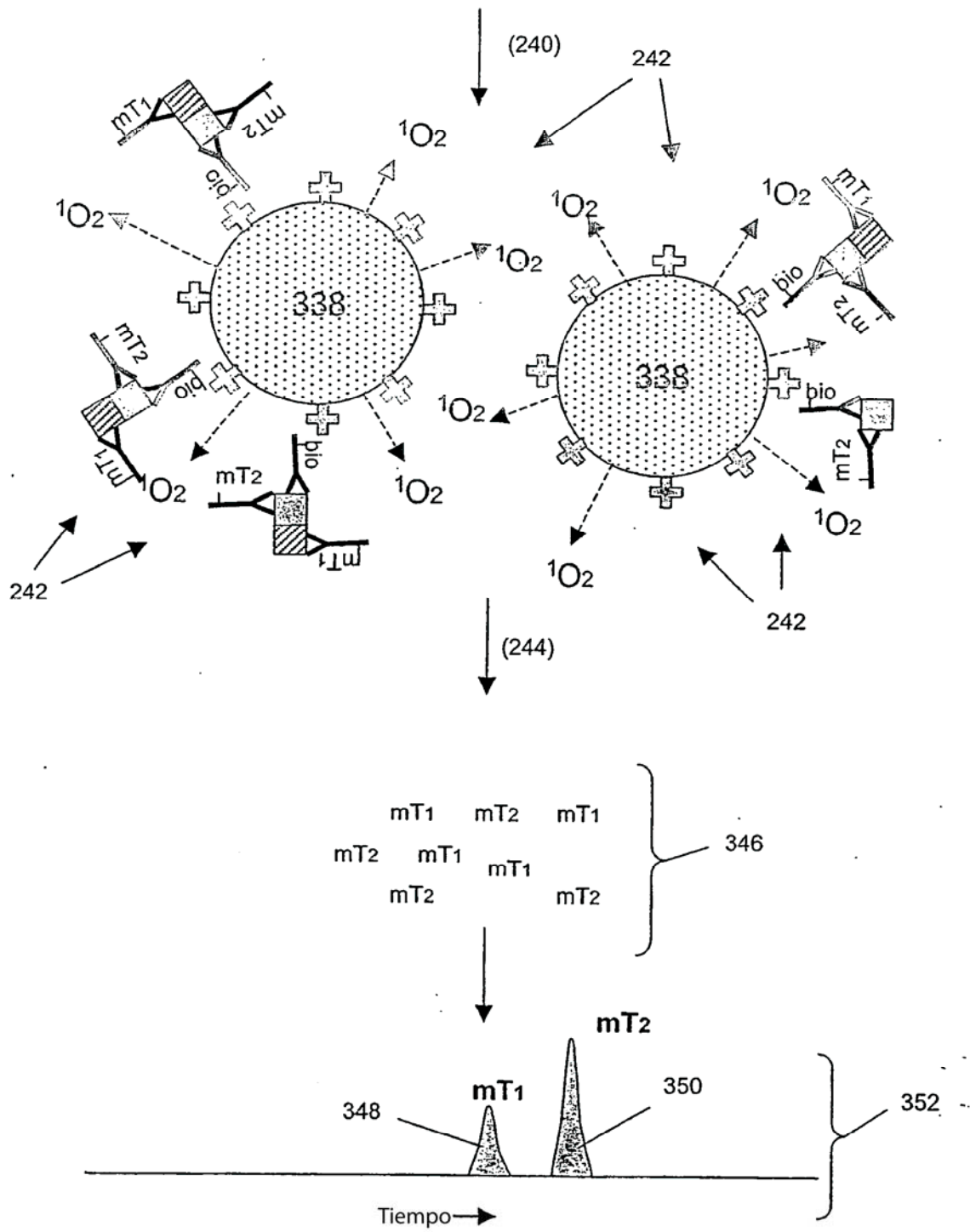


Fig. 3D

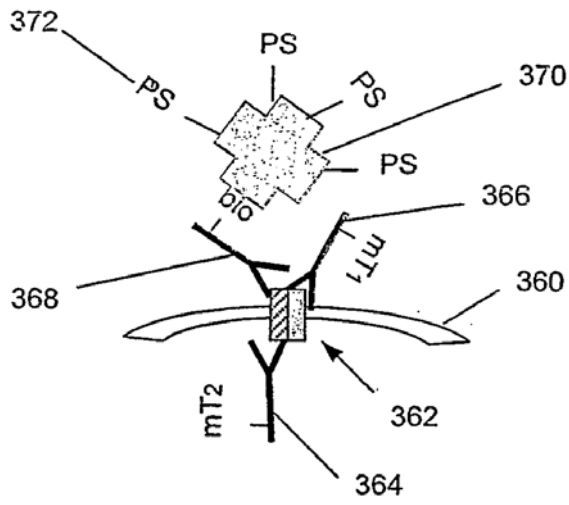


Fig. 3E

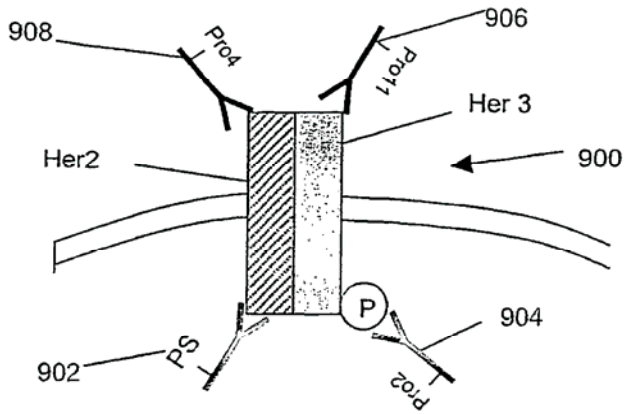


Fig. 4A

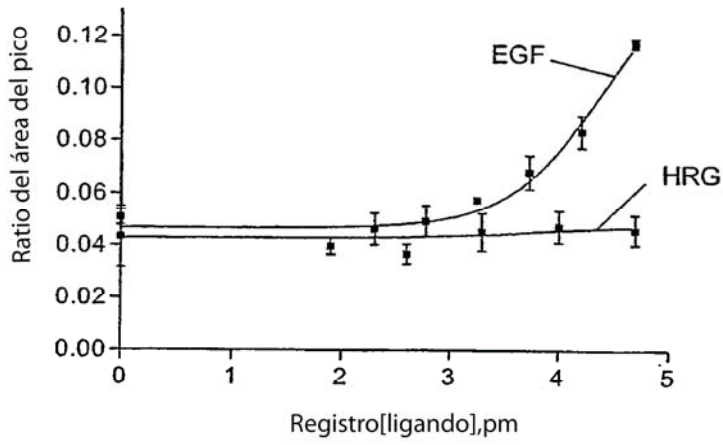


Fig. 4B

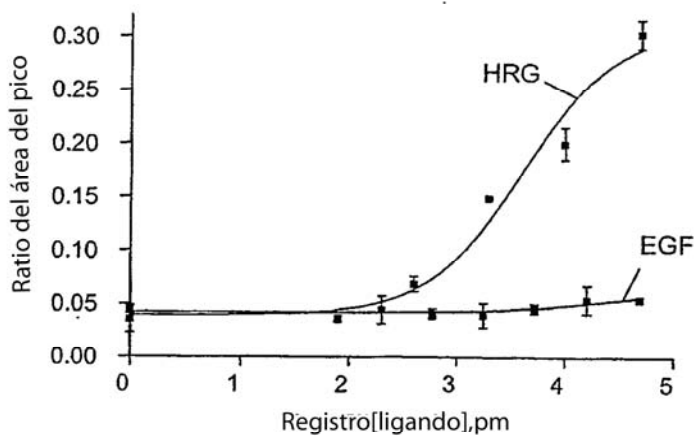


Fig. 4C

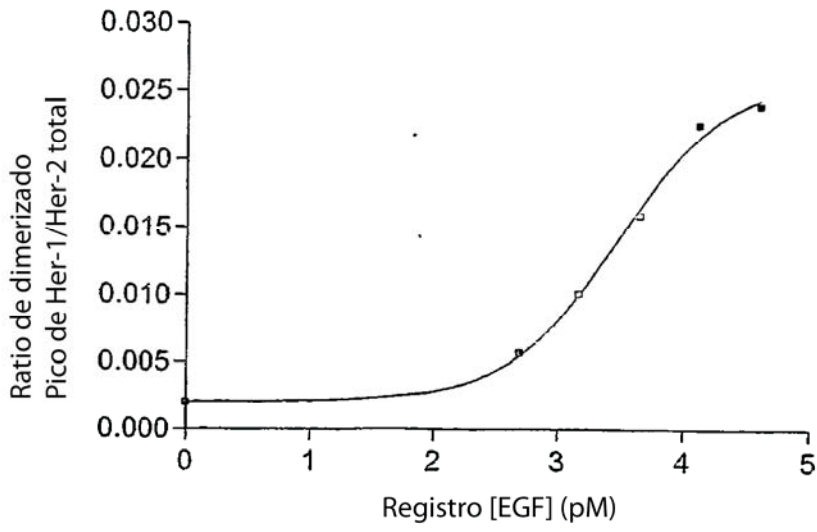


Fig. 4D

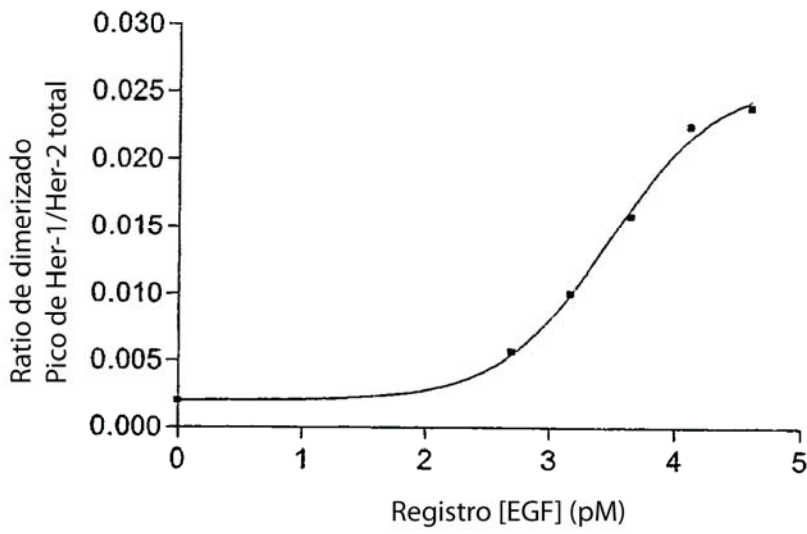


Fig. 4E

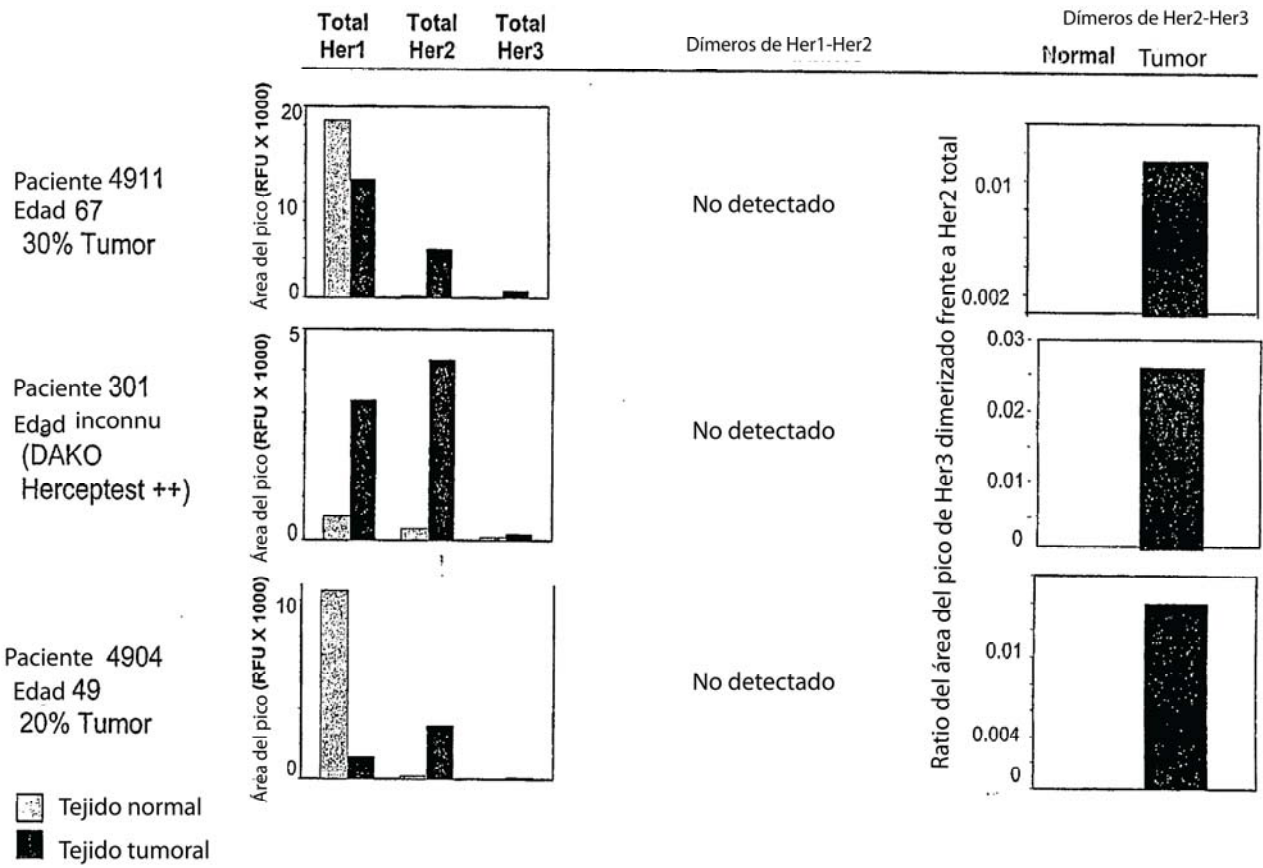


Fig. 5A

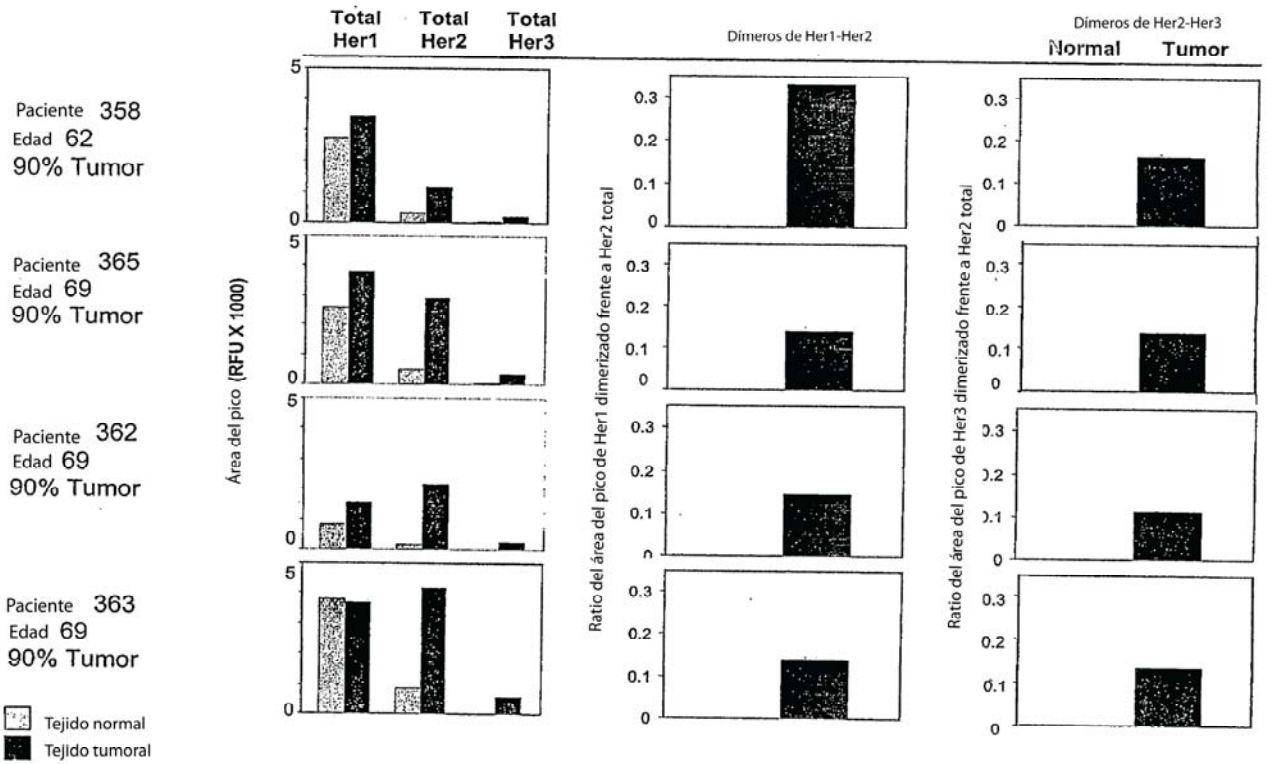


Fig. 5B

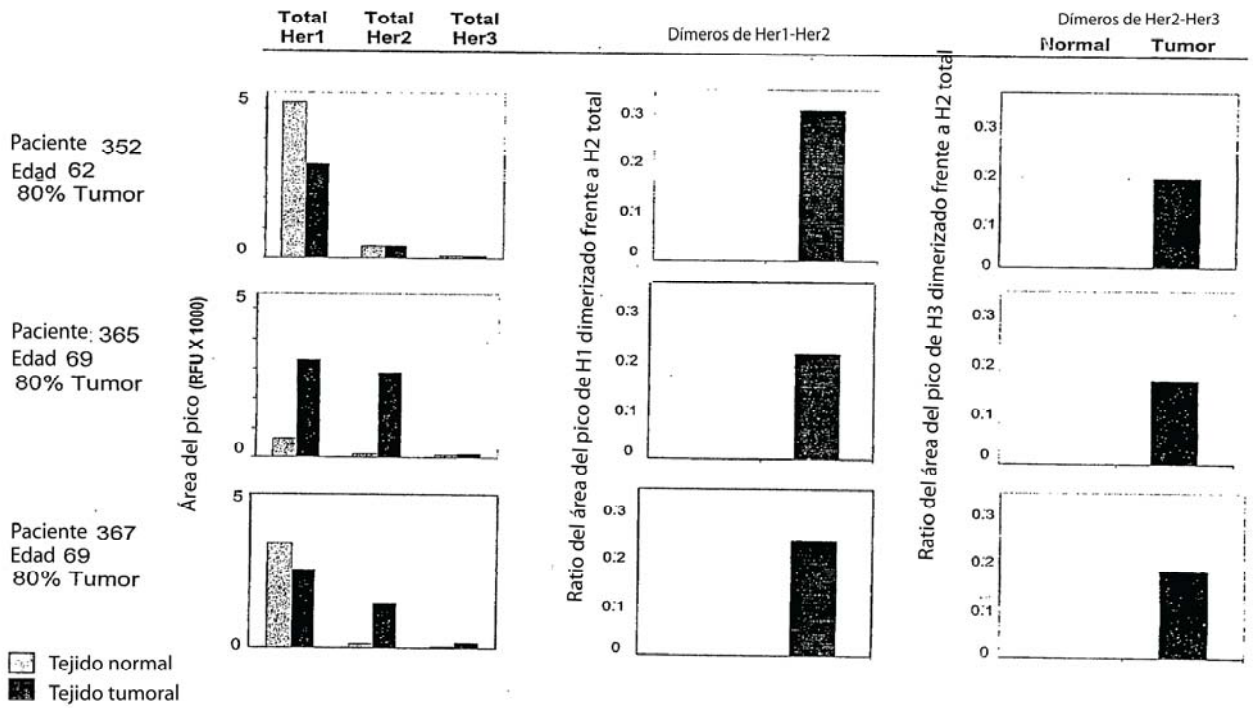


Fig. 5C

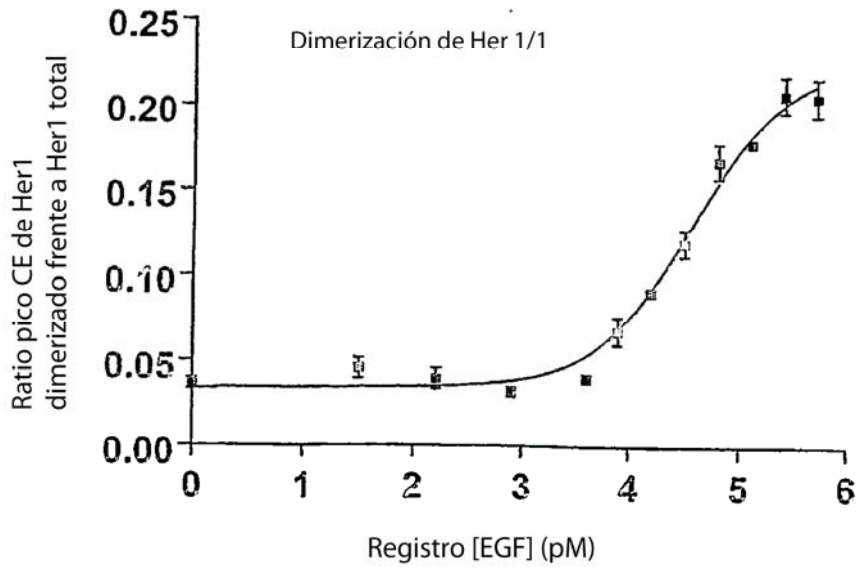


Fig. 6A

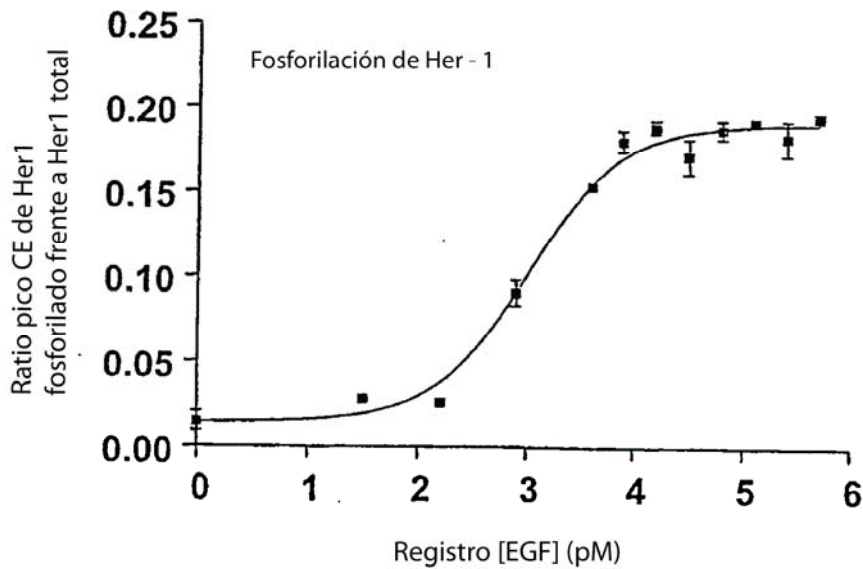


Fig. 6B

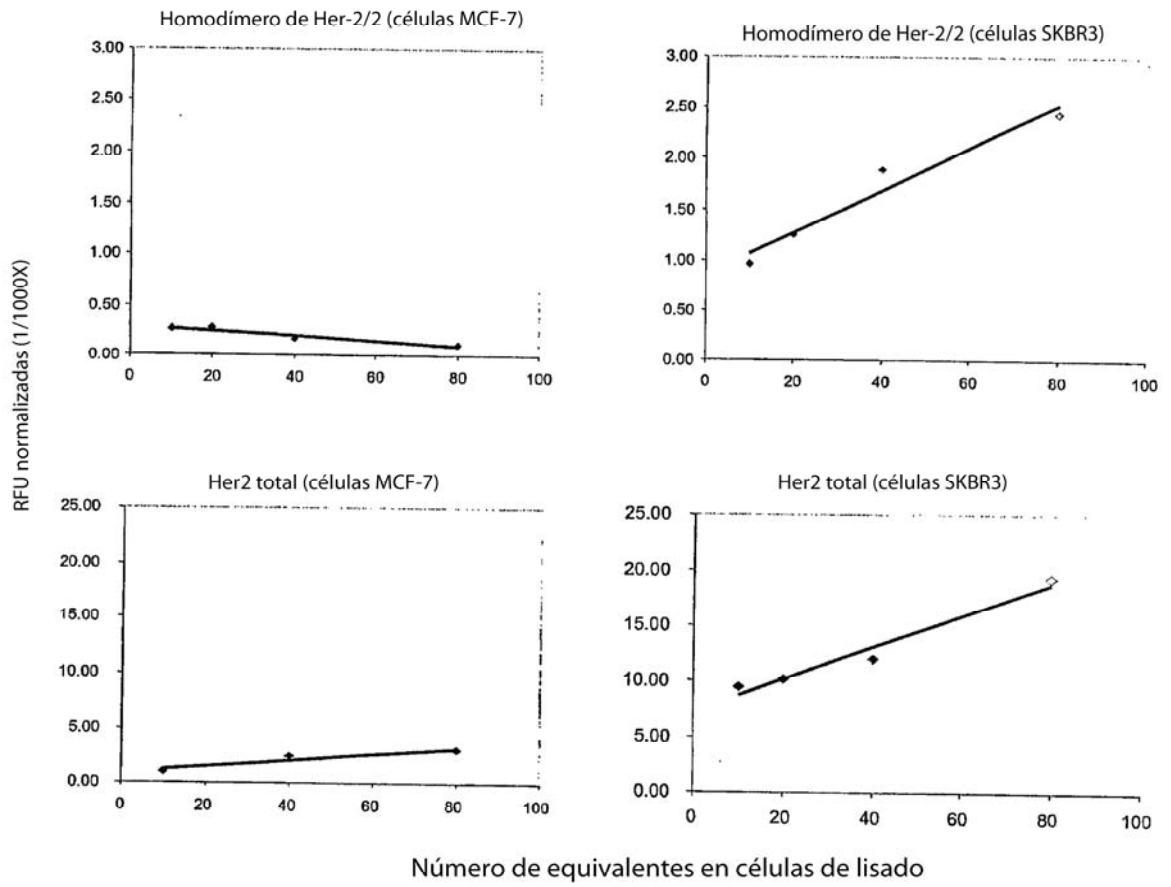


Fig. 7



Fig. 8A

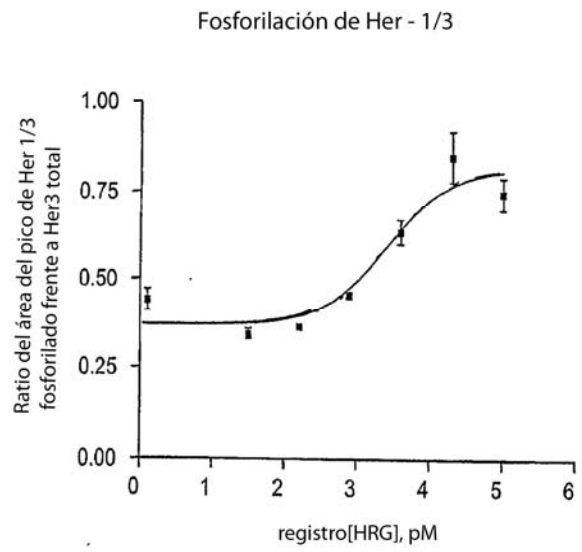


Fig. 8B

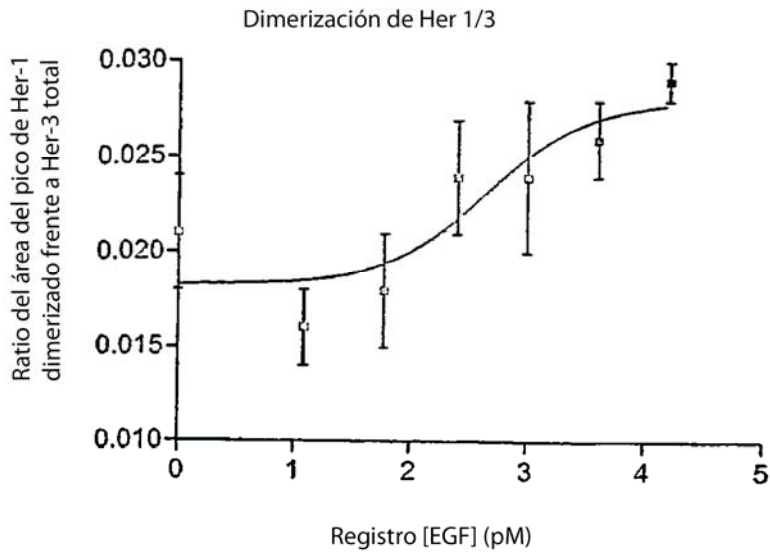


Fig. 9A

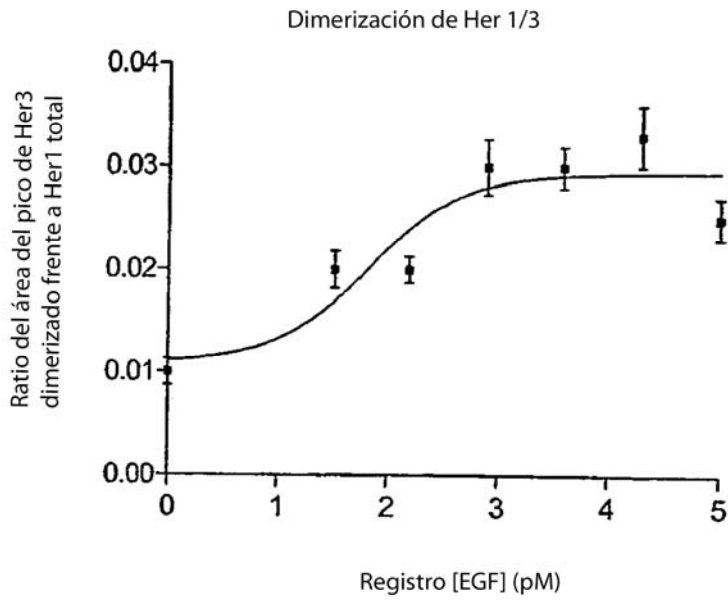


Fig. 9B

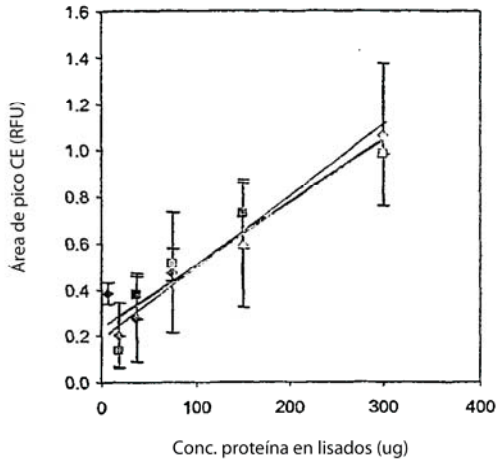


Fig. 10A

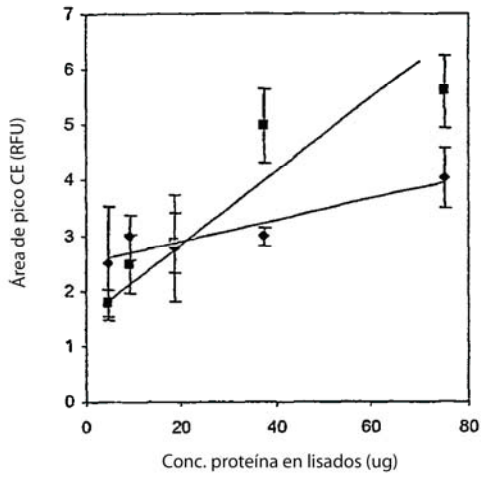


Fig. 10B

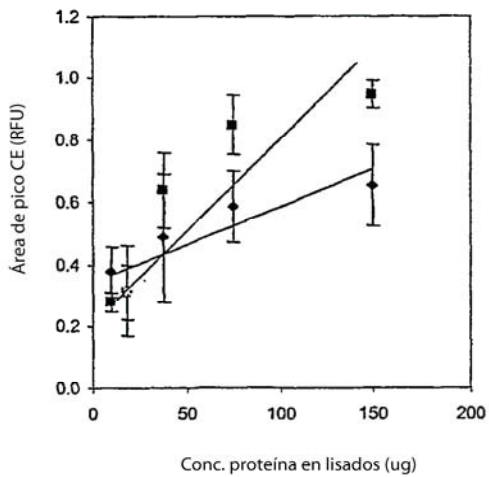


Fig. 10C

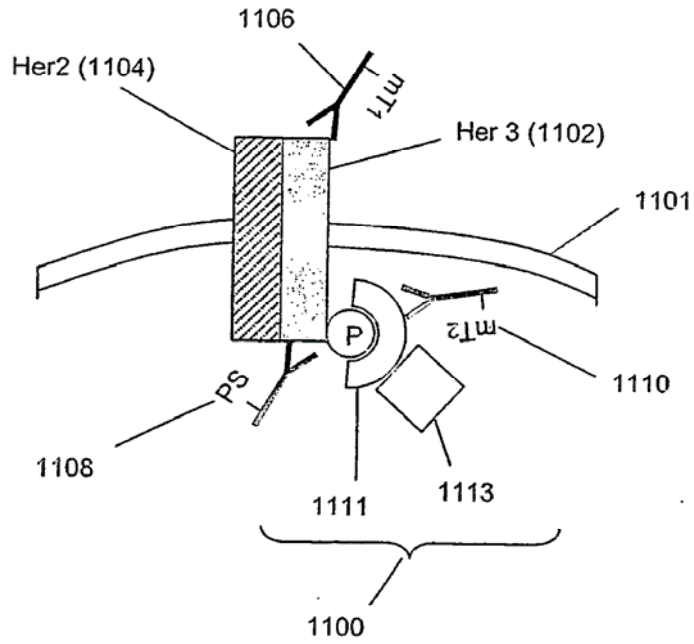


Fig. 11A

Complejo PI3K/Her-3 en células MCF-7

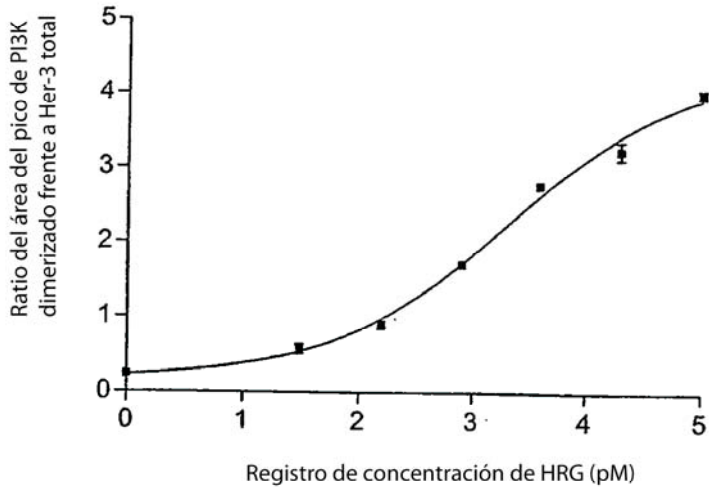


Fig. 11B

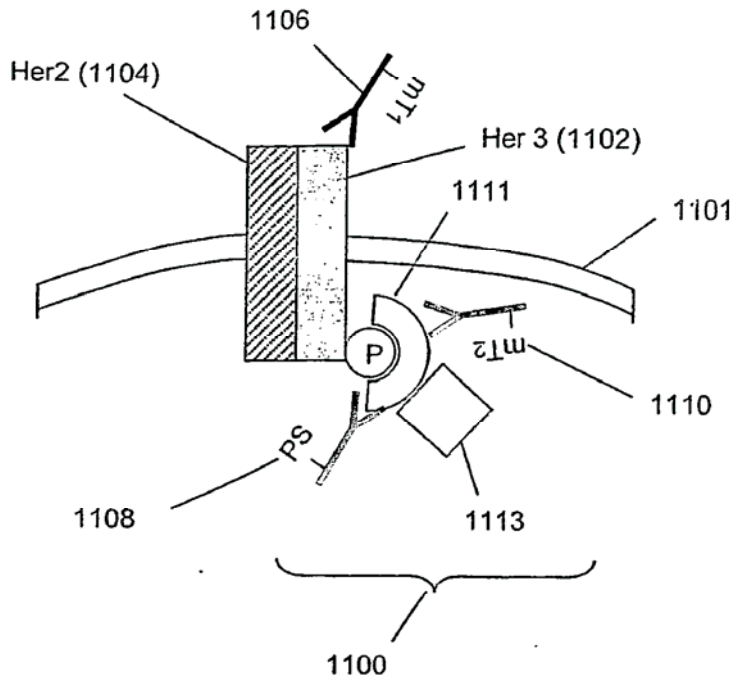


Fig. 11C

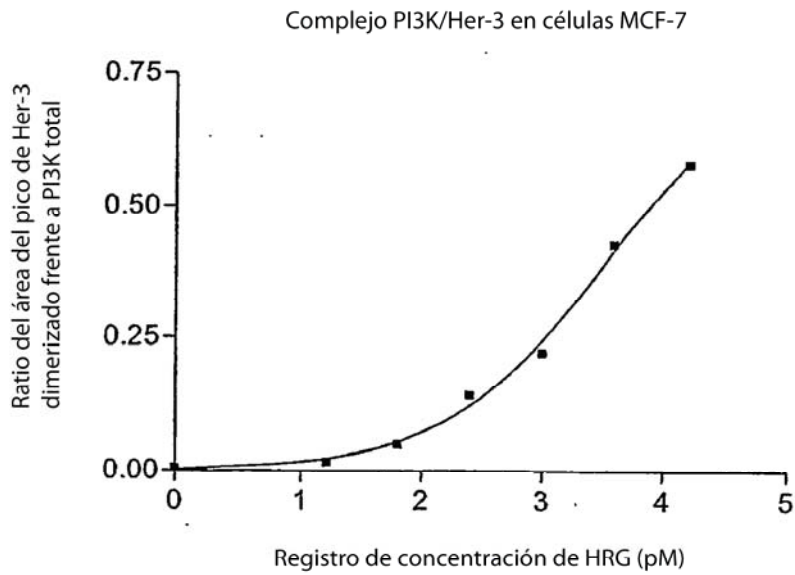


Fig. 11D

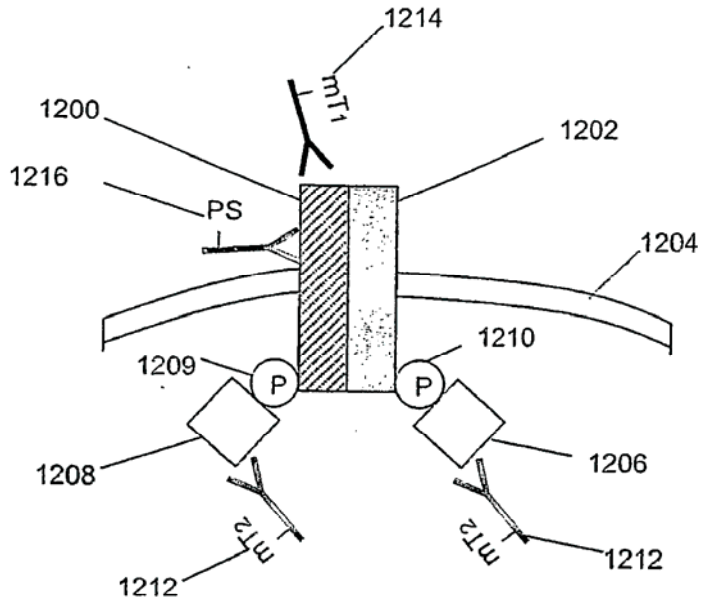


Fig. 12A

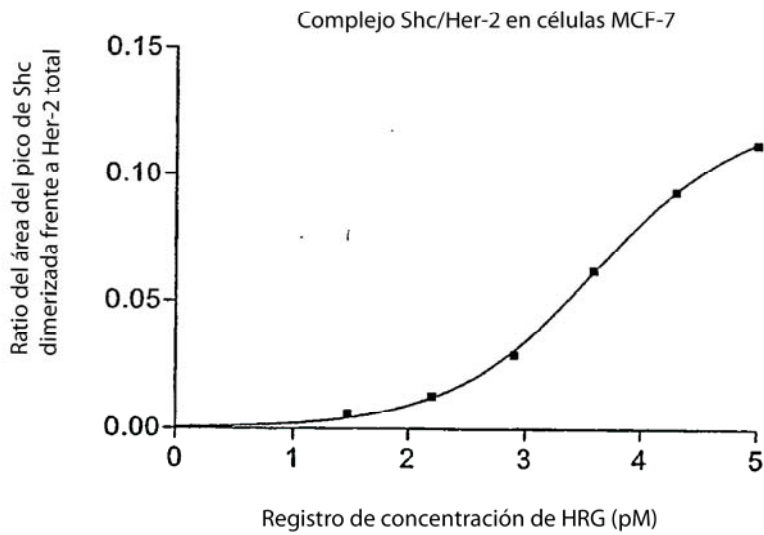


Fig. 12B

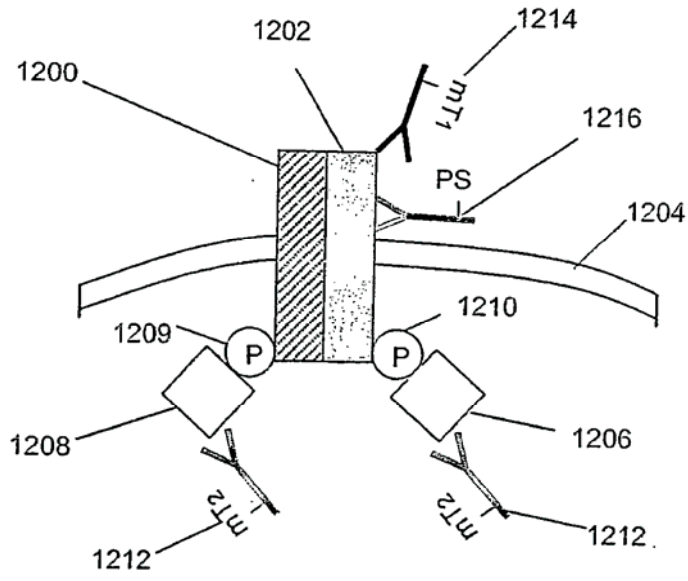


Fig. 12C

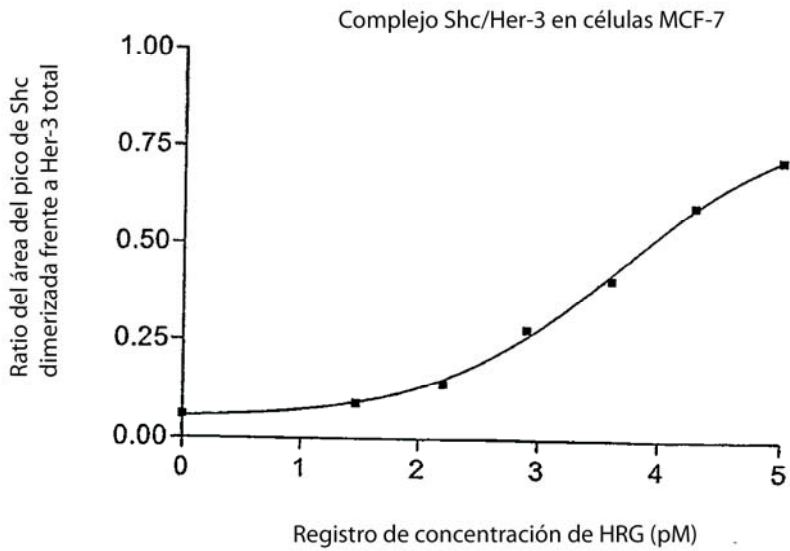


Fig. 12D

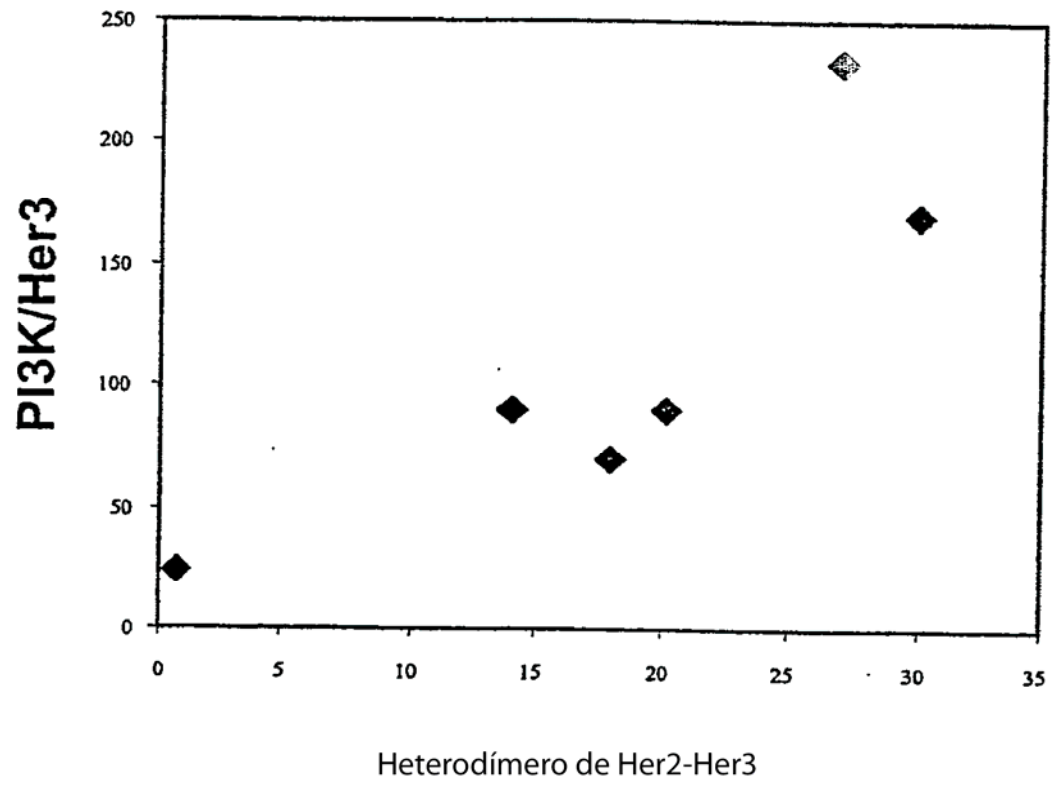


Fig. 13

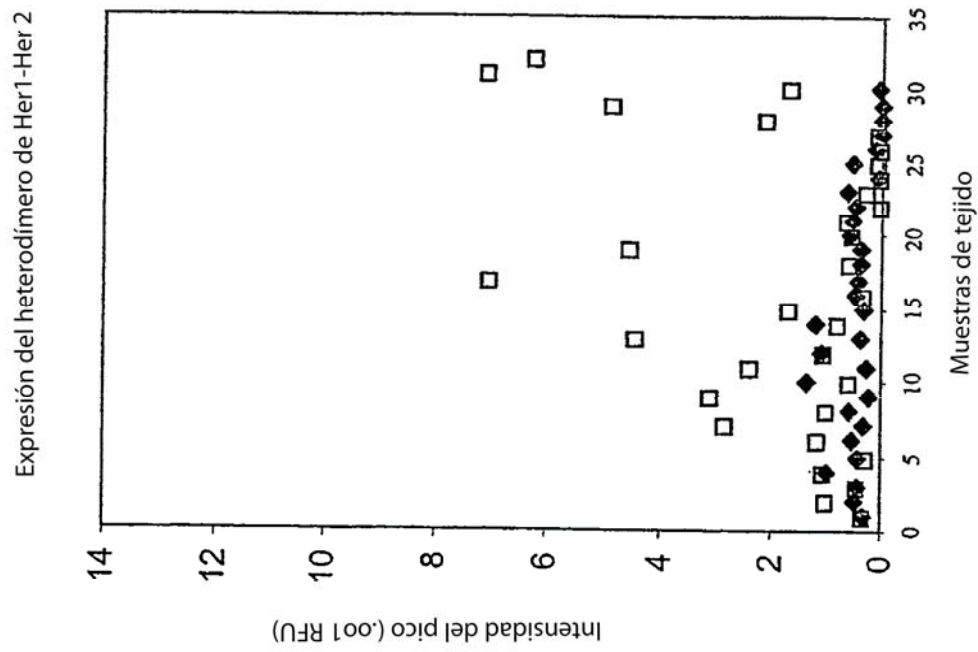
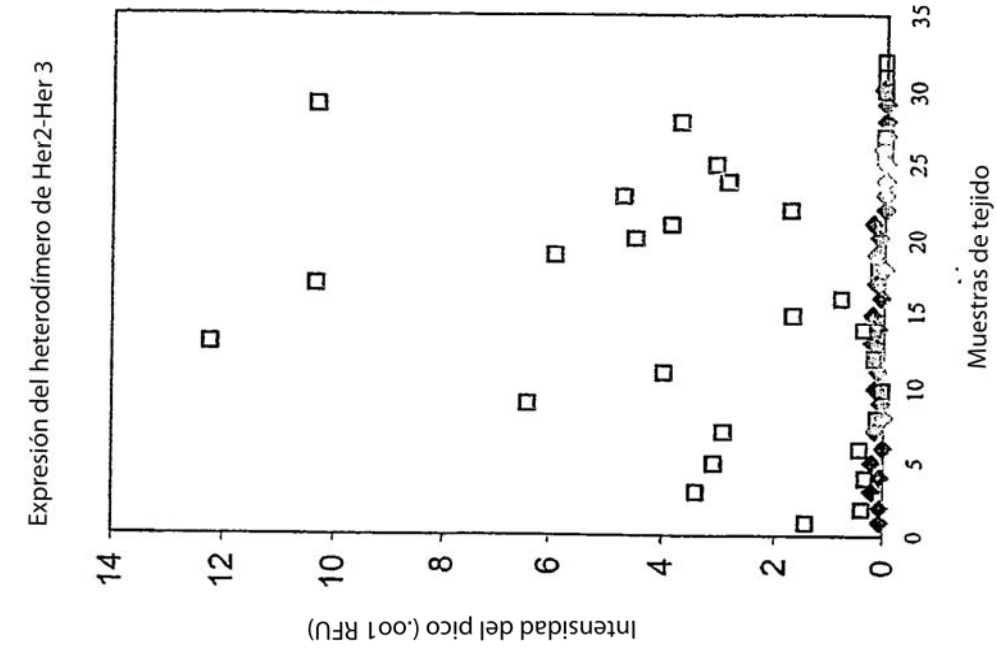


Fig. 14A

Fig. 14B

Secciones FFPE de células MDA-MB-468 sobre portaobjetos de vidrio

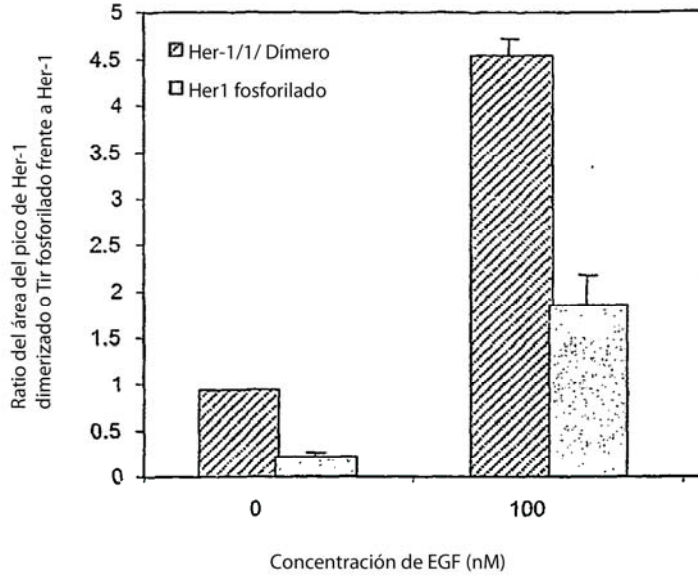


Fig. 15A

Ensayo de Her-2/2 - secciones de parafina de MCF7 y SKBR3

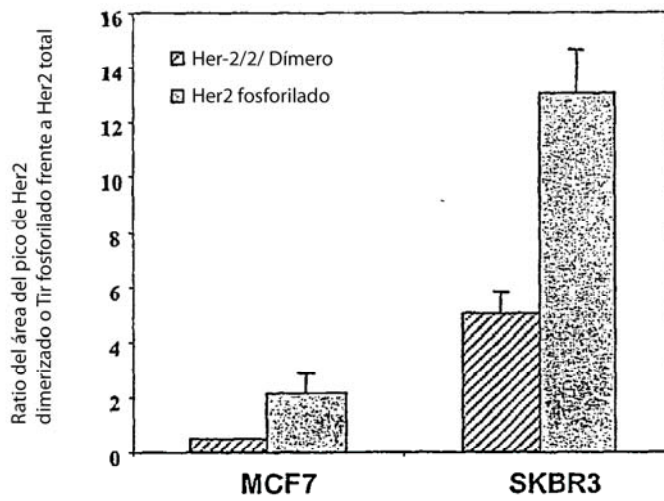


Fig. 15B

Secciones FFPE de células MCF-7 sobre portaobjetos de vidrio

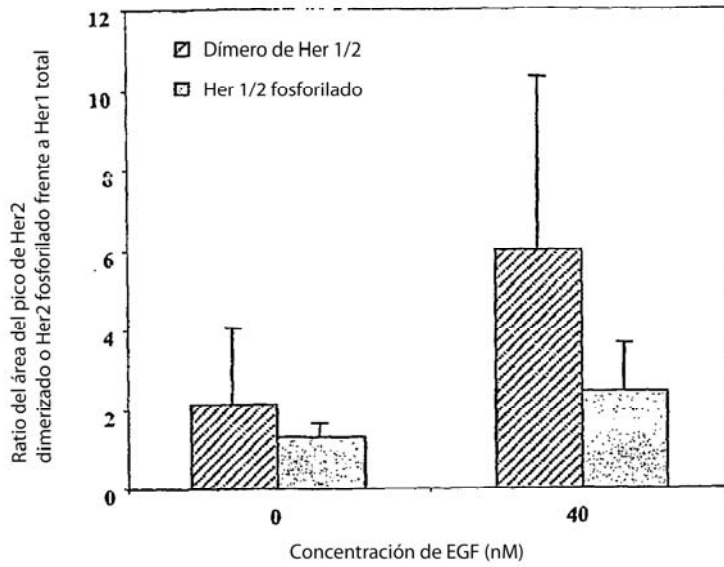


Fig. 15C

Secciones FFPE de células 22Rv1 sobre portaobjetos de vidrio

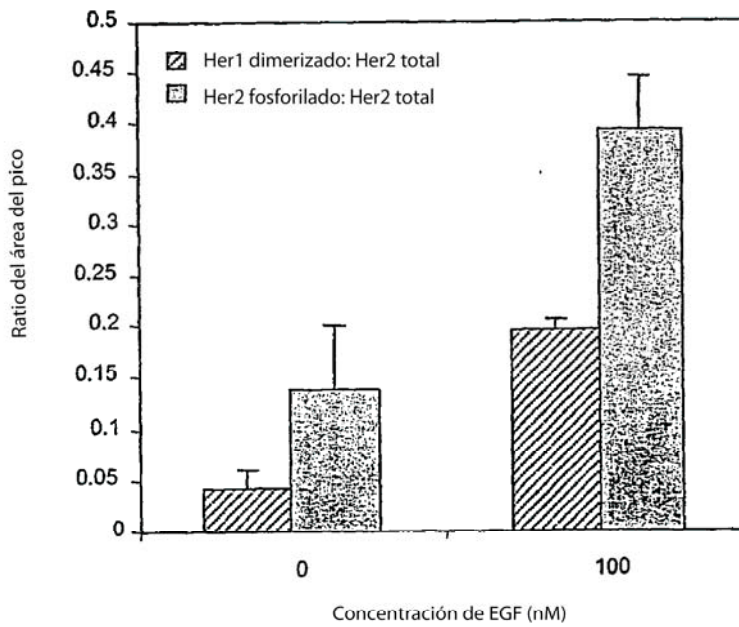


Fig. 15D

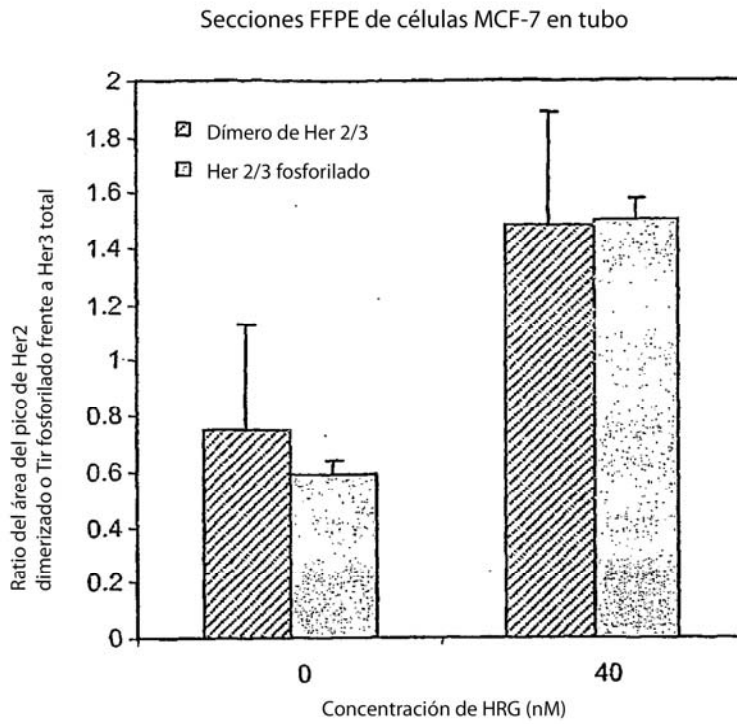


Fig. 15E

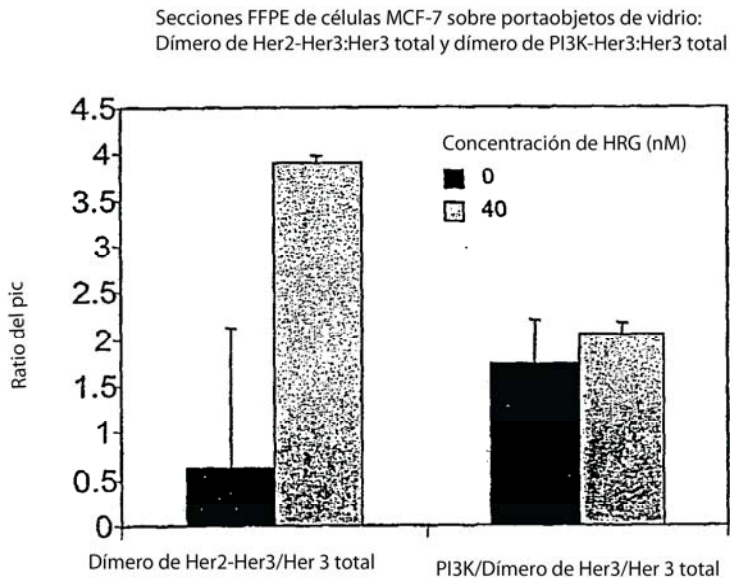


Fig. 15F

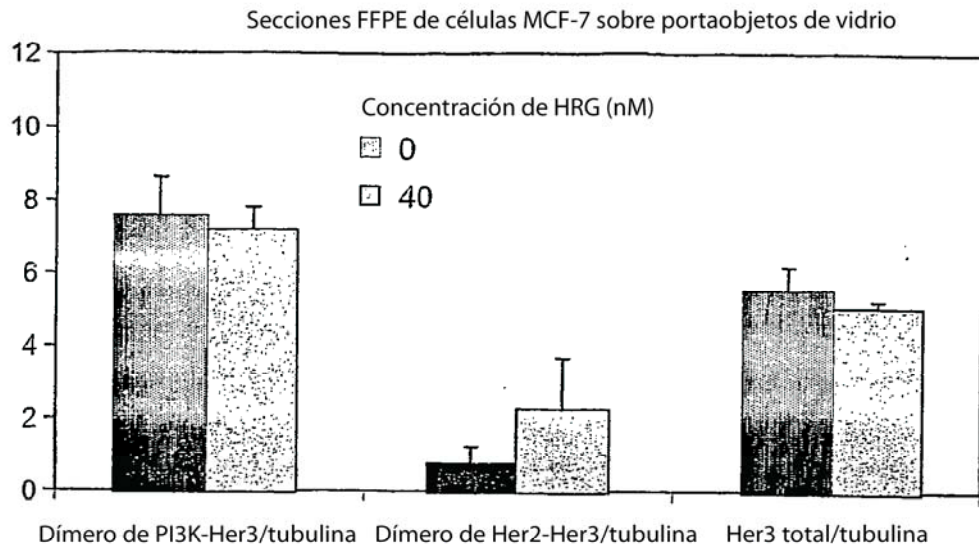


Fig. 15G