

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 315**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2009 E 09812308 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 2318836**

54 Título: **Activación de la pan-quinasa y evaluación de las vías de señalización**

30 Prioridad:

04.09.2008 US 94304 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2013

73 Titular/es:

BECKMAN COULTER, INC. (50.0%)
250 S. Kraemer Boulevard
Brea, CA 92821, US y
UNIVERSITY HEALTH NETWORK (50.0%)

72 Inventor/es:

HEDLEY, DAVID;
CHOW, SUSAN y
SHANKEY, T. VINCENT

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 429 315 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

Activación de la pan-quinasa y evaluación de las vías de señalización

5 Ciertos modos de realización de la presente invención hacen referencia a métodos para determinar el estado de activación de una proteína de señalización de vía de transducción de señales. En al menos algunos modos de realización, se proporcionan métodos para la monitorización de la eficacia de un inhibidor de transducción de señales en un paciente. La presente invención además proporciona ensayos de alta sensibilidad, útiles en poblaciones de pacientes en las que resulta difícil obtener una muestra celular grande, por ejemplo, en neonatos. Ciertos modos de realización de la presente invención hacen referencia a métodos para la identificación de nuevos inhibidores de proteínas de las vías de transducción de señales. Algunos modos de realización de la invención hacen referencia a métodos para detectar sepsis en una muestra de un paciente.

15 Muchas enfermedades se caracterizan por interrupciones en las vías de señalización celular que conducen a patologías que incluyen un crecimiento y proliferación descontrolada de células cancerígenas, además de procesos de inflamación anormal. Tales defectos pueden incluir cambios en la actividad de las quininas lipídicas, un tipo de enzimas que cataliza la transferencia de grupos fosfatos a lípidos. Estos lípidos fosforilados, a su vez, reclutan proteínas aguas abajo (downstream) que propagan las señales que se originan a partir de los mediadores de señalización aguas arriba (upstream), tales como receptores tirosina quinasa y receptores antigénicos. Por ejemplo, la proteína quinasa Akt es reclutada por fosfolípidos hasta la membrana plasmática donde es activada. Una vez activada, la Akt juega un papel central en la supervivencia tanto de los tejidos normales, como de los cancerígenos.

20 Las fosfoinositol 3-quininas (PI3Ks) son una familia de quininas lipídicas que juegan un papel fundamental en la señalización de vías aguas abajo de múltiples receptores de la superficie celular, que controlan el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular. Las PI3Ks activas consisten en dos sub-unidades: una sub-unidad reguladora con un peso molecular de 85 o 55 kD (p85 o p55), y una sub-unidad catalítica con un peso molecular de 110 kD (p110). Aunque las sub-unidades reguladoras son cruciales para la función de las PI3K, estas sub-unidades reguladoras también transmiten señales independientemente de la PI3-quinasa (Ueki et al., J Biol. Chem. Noviembre 28; 278(48): 48453-66 (2003)). Recientemente, se ha demostrado que la p85-alfa puede inducir la apoptosis a través del factor de transcripción inducible NAFT3 (Factor nuclear de linfocitos T activados, NAFT por sus siglas en inglés), independiente de la vía de señalización de la PI3K (Song et al., Mol. Cell. Biol. 27: 2713-2731 (2007)).

30 La vía de PI3K se encuentra implicada en diversas enfermedades humanas, incluyendo la diabetes, fallo cardiaco y muchos tipos de cáncer (ver, por ejemplo, Kim et al., Curr. Opin. Investig. Drugs. Diciembre; 6(12): 1250-8 (2005)), que incluyen el cáncer colorectal, leucemia mieloide aguda, cáncer de mama, gliomas, y cáncer de ovarios. Los inhibidores de PI3K se están estudiando como una terapia potencial en una variedad de enfermedades que incluyen el cáncer, fallo cardiaco y trastornos inflamatorios/autoinmunes.

35 La vía de transducción de señales de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés), se encuentra también implicada en la proliferación y diferenciación celular. Esta vía desempeña un papel en la regulación de la maduración meiótica de ovocitos (Moriguchi et al., Adv. Pharmacol. 36:121-137 (1996); Murakami et al., Methods in Enzymology 283:584-600 (Dunphy, ed., 1997); Matten et al., Seminars in Dev. Biol. 5:173-181 (1994)).

40 La vía MAPK está también implicada en la regulación del crecimiento, supervivencia y diferenciación celular (Lewis et al., supra). Además, se han detectado MAPK activada y/o un elevado nivel de expresión de MAPK en una variedad de tumores en humanos (Hoshino, R. et al., Oncogene 18:813-822 (1999); Salh, B. et al., Anticancer Res. 19: 741-48 (1999); Sivaraman, V. S. et al., J. Clin. Invest. 99:1478-483 (1997); Mandell, J. W et al., Am. J. Pathol. 153:1411-23 (1998); Licato, L. L. et al. Digestive Diseases and Sciences 43, 1454-1464 (1998)), y pueden estar asociadas a actividades invasivas, metastásicas y angiogénicas de las células tumorales. Por tanto, la activación inadecuada de la vía de la MAPK es una característica esencial común a muchos tipos de tumores. Por esta razón, los participantes en esta vía de señalización, tales como MEK, son dianas potenciales para la terapia contra el cáncer.

45 Varios grupos han desarrollado ensayos para monitorizar inhibidores de diversas vías de transducción de señales. Un ensayo, que detecta la actividad de inhibidores de la vía de PI3K>Akt, utiliza plaquetas de sangre periférica ((Bowers et al. Mol., Cancer Ther. 6:2600-2607 (2007)). Sin embargo, este ensayo únicamente mide el impacto de la inhibición de esta vía (inhibición de la activación de plaquetas), y no monitoriza directamente la fosforilación (activación) de las proteínas de señalización diana. Además, las dificultades técnicas hacen que la medición de esta vía utilizando plaquetas de sangre periférica suponga un desafío.

55 De forma similar, West et al. (J. Trauma Injury, Inf. and Crit Care 62:805-811 (2008)), describieron un ensayo basado en citometría de flujo para detectar sepsis, que utilizaba la carencia de activación de monocitos en sangre periférica (medida por fosforilación de p38 y ERK), seguido de exposición in vitro a lipopolisacáridos (LPS). Sin embargo, en

este ensayo no se confirmó especificidad, y no se observó la activación temprana de ERK o la activación secundaria de todas las vías de las tres MAPK. Este ensayo fue también susceptible de niveles basales inaceptablemente elevados para un ensayo clínicamente relevante. Por ejemplo, a partir de sus resultados los autores concluyen que en controles normales, el porcentaje de monocitos que expresan fosfo-ERK aumenta desde el 35% sin estimulación con los LPS, hasta el 58% positivo después de tratamiento con LPS in vitro (medido en un punto de tiempo de 15 min después de la adición de LPS). Por el contrario, los pacientes presumiblemente sépticos mostraron un 25% de monocitos de P-ERK antes de la adición de LPS, que aumentó en menos de un 10% a continuación de la adición de LPS in vitro.

La monitorización farmacodinámica de los agentes dirigidos a moléculas en la sangre periférica de pacientes con leucemia, utilizando citometría de flujo, se encuentra ya descrita (David W. Hedley et al. Toxicol. Pathol. 36: 133-139 (2008)).

Existe la necesidad en el arte de un ensayo que pueda monitorizar de forma precisa la eficacia de un inhibidor de transducción de señales en un paciente. Existen otras necesidades para detectar y monitorizar ciertas enfermedades y trastornos que están asociados con la activación aberrante de una proteína de señalización de la vía de transducción de señales. Los ensayos actuales se basan en técnicas de inmunoblot que no pueden identificar el tipo de célula que realmente genera la respuesta en una población de células mixta. Además, al tener que eliminar el fármaco de las muestras, estos ensayos resultan engorrosos y están sujetos a una carencia de sensibilidad. Los ensayos sensibles se requieren especialmente en pacientes en los que obtener una muestra grande es difícil, por ejemplo, en neonatos.

En un modo de realización, la presente invención proporciona un método para determinar el estado de activación de una proteína de señalización de la vía de transducción de señales en una muestra que contiene leucocitos (es decir, una muestra de sangre) que comprende: a) activar las proteínas activables de al menos una vía de transducción de señales en los leucocitos de la muestra, exponiendo la muestra a un activador de pan-quinasa; b) conservar la muestra con un conservante; c) desenmascarar epítopos intracelulares de los leucocitos conservados en la muestra; d) poner en contacto los epítopos intracelulares de los leucocitos conservados con una pluralidad de moléculas de captura marcadas con fluorescencia, donde dichas moléculas de captura comprenden, al menos, dos moléculas de captura diferentes, capaces de unirse al estado activado de al menos dos epítopos intracelulares desenmascarados diferentes de leucocitos conservados y activados en la muestra, y al menos una molécula de captura de control, en donde la molécula de captura de control se une a un epítipo en los leucocitos conservados que es inactivado (es decir, no activado) por parte del activador de pan-quinasa; e) detectar la intensidad media de fluorescencia de los leucocitos conservados y activados, capturados por la unión de las moléculas de captura al estado activado de los epítopos intracelulares desenmascarados; f) detectar la intensidad media de fluorescencia de los leucocitos conservados capturados mediante la unión de la molécula de captura de control; y g) comparar la intensidad media de fluorescencia de los leucocitos conservados y activados detectados, capturados por las moléculas de captura, con la intensidad de fluorescencia media de los leucocitos conservados detectados, capturados por las moléculas de captura.

En algunos modos de realización, el método además comprende evaluar la intensidad media de fluorescencia comparada medida en la etapa g), con la intensidad media de fluorescencia comparada medida en una muestra de referencia inactivada.

En otros modos de realización, el método es, por ejemplo, un método en donde la muestra procede de un paciente, y donde la evaluación de la intensidad media de fluorescencia indica que el paciente presenta una enfermedad o condición asociada a la transducción de señales cuando la intensidad media de fluorescencia de las muestras activadas e inactivadas son aproximadamente comparables.

En al menos algunos modos de realización, el método comprende la repetición de las etapas a) a g) con una muestra del paciente después de que dicho paciente haya recibido un agente terapéutico para tratar la inflamación, fiebre, sepsis, cáncer, diabetes, o fallo cardíaco y monitorizar la efectividad de dicho agente terapéutico mediante su monitorización para un cambio en la intensidad media de fluorescencia detectada entre las muestras activadas e inactivadas.

La presente invención proporciona, además, métodos en donde la evaluación de la fluorescencia detectada indica que el inhibidor de la quinasa es efectivo en el tratamiento del paciente con la enfermedad o condición asociada a la transducción de señales, cuando un cambio se determina en la intensidad media de fluorescencia detectada entre las muestras activadas e inactivadas.

La presente invención proporciona métodos en donde la muestra ha sido expuesta a un inhibidor putativo de la quinasa, y en donde el método además comprende determinar la efectividad del inhibidor de la quinasa cuando la muestra activada no demuestra un cambio en la intensidad de la fluorescencia media de las proteínas activables de la, al menos una, vía de transducción de señales.

Modos de realización, características y ventajas adicionales de la invención, además de la estructura y operación de diversos modos de realización, se describen en detalle a continuación en referencia a las figuras adjuntas.

5 Las figuras adjuntas, que se incorporan en la presente patente y forman parte de la especificación, ilustran uno o más modos de realización de la invención y, junto con la descripción, son adecuadas además para explicar los principios de la invención.

La Figura 1 muestra un esquema general de la activación intracelular por parte de los lipopolisacáridos (LPS) en monocitos.

La Figura 2 muestra la medición simultánea de 3 miembros de la vía de MAPK (p38, JNK, y ERK) en sangre entera no estimulada. La CD14 se utilizó para identificar monocitos en muestras de sangre entera.

10 La Figura 3 muestra sangre entera normal estimulada con LPS durante 10 minutos a 37 °C, que muestra que todos los monocitos de CD14+ han activado las p-38, JNK y ERK.

La Figura 4 muestra la cinética de la respuesta de LPS en monocitos de sangre entera. ERK demuestra la activación más temprana que se muestra en la presente patente a los 2 minutos a continuación de la estimulación con LPS a 37 °C, antes de la activación de JNK o p38.

15 La Figura 5 muestra la cinética de la respuesta en monocitos de sangre entera. Seis minutos después de la activación con LPS a 37 °C la activación de ERK disminuye. En puntos de tiempo posteriores (~ 10 minutos) p38, JNK y ERK aumentan.

20 La Figura 6 muestra la cinética de la respuesta a LPS. Después de 60 minutos de la activación con LPS, la actividad de las vías de las 3 MAPK se ve reducida pero no regresan a la línea de referencia. Si se añade LPS adicional, no se observa ningún aumento adicional en la actividad de cualquier MAPK. La re-estimulación con LPS (incluso hasta 2 horas después de la estimulación in vitro con LPS) no aumenta la señalización de estas vías.

La Figura 7 muestra la cinética de la activación de la proteína S6 ribosómica en monocitos estimulados con LPS. La activación pico de S6 se observa más tarde que en otras proteínas de la vía MAPK.

25 La Figura 8 muestra la inhibición de la activación de S6 con LPS, bien con el inhibidor de ERK (U0126) o con el inhibidor de PI3K (Ly294002), o con ambos: únicamente la inhibición de ambas vías conduce a la inhibición completa de la proteína S6 ribosómica. La inhibición de la S6 ribosómica sólo se logra mediante la inhibición tanto de la vía de ERK (en este caso utilizando U0126), como de la vía de PI3K>Akt (en este caso Ly294002). La inhibición completa de la S6 ribosómica en presencia de ambos inhibidores proporciona evidencia adicional de que PI3K se encuentra inhibida.

30 La Figura 9 muestra que en muestras normales (no expuestas previamente a LPS), los LPS inducen a una rápida activación de la quinasa ERK MAP, que se caracteriza por un pico temprano (1-4 minutos después de la adición de LPS), una caída en P-ERK, y un segundo pico a los 10-15 minutos después de la estimulación con LPS. Este segundo pico de P-ERK ocurre al mismo tiempo en que los niveles de P-p38 y P-SAPK alcanzan niveles máximos.

35 La Figura 10 muestra que tras la re-exposición a LPS, la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de P-ERK no cambia de manera significativa sobre el tiempo 0 de control, para periodos de hasta 90 minutos después de la re-estimulación con LPS.

40 La Figura 11, superior izquierda, muestra que se detectó aproximadamente el 10-15 % de monocitos (CD14+) que expresan P-p38 en muestras de sangre entera no estimulada, procedentes de donantes normales. Después de una estimulación primaria con LPS, la totalidad de la población de monocitos (~100%) muestra un aumento significativo en la MFI, con la respuesta que alcanza un valor de MFI máximo a los 15 minutos después de la estimulación con LPS. Los niveles de P-p38 no vuelven a los niveles basales, incluso después de periodos de 120 min, mostrando la distribución bi-modal que se observa en la Figura 11, inferior izquierda. Después de la re-exposición a LPS, el porcentaje de monocitos positivos para P-p38 aumenta desde el 40% (tiempo 0, inferior izquierda) hasta 46% (15 min después de la re-exposición a LPS, inferior derecha). La MFI acumulada fue 5,0 en el tiempo 0 (inferior izquierda), y 5,5 a los 15 minutos después de la re-exposición a LPS (inferior derecha).

45 En la Figura 12, superior izquierda, en individuos normales, el nivel de P-S6 en monocitos no estimulados es bajo, con ~10% de los monocitos que muestran niveles heterogéneos y positivos de expresión de P-S6. Los niveles de P-S6 alcanzan su valor pico tras 15-60 minutos después de la estimulación con LPS, lo que es consecuente con su activación aguas abajo secundaria a la activación de P-ERK. Al contrario que P-ERK y P-p38, los niveles de P-S6 persisten durante >120 minutos a continuación de la estimulación con LPS (Figura 12, inferior izquierda). A

continuación de la re-estimulación con LPS, se producen pocos cambios en la MFI de la población de P-S6, con una disminución gradual en la MFI, tal como se muestra en la Figura 12, inferior derecha.

Visión general

5 En un modo de realización, la invención hace referencia a métodos para determinar el estado de activación de una proteína de señalización de las vías de transducción de señales en una muestra que contiene leucocitos. Otras realizaciones proporcionan métodos de monitorización de la eficacia de un inhibidor de transducción de señales en un paciente o muestra de ensayo. En ciertos modos de realización, los métodos proporcionan un ensayo altamente sensible que además es de utilidad en las poblaciones de pacientes en las que obtener una muestra celular grande resulta difícil, por ejemplo, en neonatos. En otro modo de realización, la invención hace referencia a métodos para la
10 identificación de nuevos inhibidores de proteínas de las vías de transducción de señales. En un modo de realización adicional, la invención hace referencia a métodos para detectar sepsis en una muestra de un paciente.

Una ventaja significativa de la presente invención es que la especificidad y la sensibilidad aumentada permite la utilización de los métodos con tamaños de muestra muy pequeños. Esto es importante en los casos en que sólo se puede obtener una muestra pequeña de un paciente, por ejemplo, en neonatos.

15 Debe señalarse que tal como se utiliza en la presente patente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un/a”, “y”, y “el/la” incluyen las referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Aunque cualquier método, dispositivo, y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente patente pueden ser utilizados en la práctica de la invención, los métodos, dispositivos, y materiales en particular se describen a continuación.
20

Preparación de la muestra de ensayo

Los términos muestra de ensayo y muestra se utilizan de forma intercambiable en la presente patente. La muestra de ensayo de la presente invención puede incluir cualquier muestra que contenga leucocitos, por ejemplo, sangre entera, plasma sanguíneo, aspirados de médula ósea (o cualquier célula obtenida de la médula ósea), orina, suero, saliva, fluido cerebroespinal, orina, líquido amniótico, líquido intersticial, heces, moco, extractos de tejido corporal o extractos celulares. En ciertos modos de realización, la muestra es una muestra sanguínea. En un modo de realización preferente, la muestra sanguínea es sangre entera. La sangre entera puede obtenerse del individuo o sujeto de ensayo utilizando procedimientos clínicos estándar.
25

30 Obtener una muestra sanguínea abarca la obtención de la muestra sanguínea directamente del paciente, por ejemplo, por parte de un flebotomista. Obtener una muestra sanguínea además abarca la obtención de una muestra sanguínea que fue obtenida previamente de un paciente, por ejemplo, un técnico de laboratorio que obtiene una muestra sanguínea de un paciente para su análisis utilizando los métodos de la presente invención. El plasma puede obtenerse a partir de muestras de sangre entera mediante centrifugación de sangre anticoagulada. Un proceso de este tipo proporciona una capa inferior de glóbulos rojos empaquetados, una capa leucocitaria intermedia y una capa de plasma sobrenadante.
35

Los leucocitos pueden ser aislados de la muestra de sangre entera mediante diversas técnicas que incluyen centrifugación en gradiente de densidad de flotación y otras conocidas en el arte. Los leucocitos, es decir, los glóbulos blancos, comprenden monocitos, linfocitos, neutrófilos, basófilos, y eosinófilos. Los monocitos son especialmente preferentes para su uso en el método de la presente invención.

40 Las muestras pueden obtenerse de un ser humano o de un mamífero significativo comercialmente, incluyendo pero sin limitarse a un mono, vaca o caballo. Las muestras pueden también ser obtenidas a partir de animales domésticos, incluyendo, pero sin limitarse a, perro o gato.

En algunos modos de realización, la muestra se obtiene de un “paciente naïve”. Por “paciente naïve” se entiende uno que no ha sido sometido a tratamiento con un inhibidor de proteínas de las vías de transducción de señales. En ciertos modos de realización, la muestra se obtiene de un “paciente naïve” que sea un paciente de control con edad coincidente. Por “edad coincidente” se entiende una muestra de un paciente naïve de edad similar. En ciertos modos de realización, las muestras “de edad coincidente” se obtienen de un individuo de edad, sexo y raza similares. En algunas realizaciones, los leucocitos de edad coincidente procedentes de individuos normales se utilizan como controles negativos para establecer una correlación con la actividad de las proteínas de las vías de transducción de señales.
45
50

En algunos modos de realización, la muestra se trata con un anticoagulante. Ejemplos de anticoagulantes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la vitamina K tales como la warfarina, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), ACD (ácido-citrato-dextrosa), heparina, y 1,3-indandionas.

Activación de la vía de transducción de señales

5 Tal como se utiliza en la presente patente, una "proteína de vías de transducción de señales activable", o su equivalente gramático, hace referencia a una proteína que tiene al menos una isoforma (y en algunos casos dos o más isoformas), que corresponde con una forma específica de proteína que presenta una propiedad biológica, bioquímica o física, por ejemplo, una actividad enzimática, una modificación (por ejemplo, modificación post-traslacional), o una conformación en particular. La proteína activable puede estar activada o inactivada (es decir, no
10 activada) con respecto a una actividad, modificación, o conformación biológica en particular. De manera específica, la forma activada o activa de la proteína de vías de transducción de señales activable tiene la actividad, modificación, o conformación biológica en particular, mientras que la forma inactivada o inactiva (no activa) de la proteína de vías de transducción de señales no tiene (o tiene un nivel menor o disminuido de) la actividad, modificación, o conformación biológica en particular, respectivamente. En algunos modos de realización, puede
15 existir más de una isoforma asociada con una actividad o un estado de activación; por ejemplo, puede existir una isoforma asociada con una conformación "abierta" disponible para la unión del sustrato, una isoforma de un segundo estado de transición, y una isoforma desprovista de actividad (por ejemplo, en la que la actividad es inhibida).

En cierto modo de realización, la propiedad biológica, bioquímica o física (por ejemplo, actividad enzimática, modificación, o conformación) de las proteínas de las vías de transducción de señales, se pueden inducir o activar
20 mediante un agente de activación o mediante eventos de señalización celular. Ejemplos de agentes de activación incluyen, pero no se limitan a, quinasas, fosfatasa (por ejemplo, caspasas), y hormonas. Ejemplos de eventos de señalización celular incluyen, pero no se limitan a, agrupamiento de receptores o unión de una molécula o ligando afín.

Tal como se utiliza en la presente patente, una isoforma hace referencia a una forma de proteína que se puede
25 activar que presenta una actividad biológica, modificación, o conformación específica y preferentemente detectable. La isoforma puede ser una forma activada (o activa), o una forma inactivada (o no activa) de un receptor que se puede activar. Tal como se ha mencionado, en ciertos modos de realización, la unión de una molécula de captura específica en estado de activación (tal como un anticuerpo) a una isoforma correspondiente de un elemento receptor que se puede activar, es indicativa del estado de activación del elemento receptor activable. En un cierto modo de
30 realización, la invención proporciona métodos para determinar un perfil de la isoforma del elemento receptor que comprenden la determinación de la presencia de una isoforma de un elemento receptor activable que está activado (o isoforma activada).

En un cierto modo de realización, la isoforma activada o el estado activado de un elemento receptor activable, es
35 una forma de receptor que se puede activar que presenta una propiedad biológica, bioquímica, o física particular o específica que no posee al menos otra isoforma del elemento receptor activable. Ejemplos de tales propiedades incluyen, pero no se limitan a, actividad enzimática (por ejemplo, actividad de la quinasa y actividad de la proteasa), y actividad de unión del elemento receptor. Por tanto, tales propiedades particulares o específicas se denominan en ocasiones en la presente patente como actividades de estado de activación.

Un ejemplo de estado de activación es la actividad de la quinasa para un elemento receptor activado. Tal como se
40 utiliza en la presente patente, una proteína de la vía de transducción de señales con la actividad de la proteína quinasa, hace referencia a una proteína de vías de transducción de señales que cuando se activa es capaz de catalizar la fosforilación de aminoácidos, o derivados de los mismos, que poseen un grupo hidroxilo. Las quinasas preferentes son aquellas que son capaces de catalizar la fosforilación de residuos de serina, treonina, y tirosina. La actividad de la quinasa puede ser determinada suministrando un sustrato para la fosforilación por quinasa, una
45 fuente de fosfato utilizable por la quinasa, y determinando la fosforilación en presencia de quinasa.

La antigenicidad de una isoforma activada de un elemento receptor activable se puede distinguir de la antigenicidad de una isoforma no activada de un elemento receptor activable o de la antigenicidad de una isoforma de un estado de activación diferente. En un cierto modo de realización, una isoforma activada de un elemento receptor posee un
50 epítipo que se encuentra ausente en una isoforma no activada de un elemento receptor, o viceversa. En otro modo de realización, esta diferencia se debe a la adición covalente de fracciones a un elemento receptor, tal como fracciones de fosfato, o al cambio estructural en un elemento receptor, como a través del corte proteico, o a un cambio conformacional inducido de alguna otra forma en un elemento receptor que causa que el elemento presente la misma secuencia, de manera que se pueda distinguir antigénicamente. En otro modo de realización, un cambio conformacional de este tipo causa que una isoforma activada de un elemento receptor presente al menos un epítipo
55 que no se encuentre presente en una isoforma no activada, o que no presente al menos un epítipo que está presente por una isoforma inactivada (es decir, no activada) del elemento. En algunos modos de realización, los epítopos para las moléculas de captura distinguidas se centran alrededor del sitio activo del elemento receptor,

aunque como se conoce en el arte, los cambios conformacionales en un área de un elemento receptor pueden causar modificaciones en diferentes áreas del elemento también.

5 En ciertos modos de realización, la vía de transducción de señales es la vía de proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK), que es una vía de transducción de señales que afecta a la regulación génica, y que controla la proliferación celular y la diferenciación en respuesta a señales extracelulares. Esta vía está también implicada en la maduración meiótica de ovocitos. La vía MAPK se encuentra, por ejemplo, en ranas, y en mamíferos, por ejemplo ratones, ratas y humanos. Esta vía puede ser activada por citocinas tales como la IL-1 y el TNF, y ser constitutivamente activada por proteínas tales como Mos, Raf, Ras, y V12HaRas.

10 En otras realizaciones, la vía de transducción de señales es la vía PI3K. La PI3K es una vía de fosfatidilinositol 3-quinasa que media en y regula la apoptosis celular. La vía PI3K además media en los procesos celulares, incluyendo la proliferación, crecimiento, motilidad, neovascularización, mitogénesis, transformación, viabilidad, y senescencia. Los factores celulares que median en la vía PI3K incluyen PI3K, Akt, y BAD. Estos factores median en y regulan la apoptosis celular. Los factores PI3K incluyen la PI3K de clase I, un complejo enzimático citostático que incluye p85 y p110. BAD ha sido identificado como un elemento pro-apoptótico de la familia bc1-2.

15 La proteína S6 ribosómica (RPS6) pertenece a la familia S6E de proteínas ribosómicas, y está implicada en el control del crecimiento y la proliferación celular a través de la traducción selectiva (Molina H. et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 2199-2204, (2007)). Es un sustrato fundamental de la Proteína Quinasa Ribosómica S6 (RSK, por sus siglas en inglés) en ribosomas eucariotas. Durante la traducción, regula la traducción de cualquier ARN que contenga una secuencia de oligopirimidina en el extremo 5' terminal (5'TOP). La 5'TOP codifica proteínas para la progresión del ciclo celular, proteínas ribosómicas, y factores de elongación. La fosforilación de RPS6 ha sido enlazada para aumentar la traducción de 5'TOP selectiva. Los sitios fundamentales de fosforilación en RPS6 incluyen Ser235, 236, 240, y 244 (Peterson, R.T. y Schreiber, S.L., 1998). La fosforilación de RPS6 se estimula mediante factores de crecimiento, agentes promotores de tumores, y mitógenos. Durante la detención del crecimiento, RPS6 es desfosforilado.

25 En ciertos modos de realización, la Proteína de la vía de transducción de señales es la proteína S6 ribosómica de PI3K, p44/42 MAP quinasa, TYK2, p38 MAP quinasa, PKC, PKA, SAPK, ELK, JNK, cJun, RAS, Raf, MEK 1/2, MEK 3/6, MEK 4/7, ZAP-70, LAT, SRC, LCK, ERK 1/2, Rsk 1, PYK2, SYK, PDK1, GSK3, FKHR, AFX, PLCg, PLCy, FAK, CREB, α II β 3, Fc ϵ RI, BAD, p70S6K, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5, STAT6, o una combinación de estas proteínas. En realizaciones en particular, las proteínas de las vías de transducción de señales son P38 y ERK y PI3K o S6
30 ribosómica. Otras realizaciones se obtienen como resultado en los casos en que las proteínas de las vías de transducción de señales son P38, ERK, y S6 ribosómica. La LNK y S6 ribosómica proporcionan otras proteínas de las vías de transducción de señales para su uso en los métodos de la presente invención.

35 En ciertas realizaciones, la muestra se incuba con un activador de pan-quinasa. En ciertos modos de realización el activador de pan-quinasa es lipopolisacárido (LPS). El término "LPS" deberá entenderse que abarca variantes preparadas naturales y sintéticas o semi-sintéticas.

El LPS consiste en un componente lipídico, lípido A, y una unidad de polisacárido enlazado de forma covalente en el dominio de la membrana. La región de polisacárido consiste en la cadena O-específica terminal, una sub-estructura que comprende hasta 50 unidades de oligosacáridos de repetición de habitualmente dos a ocho monómeros, y la región central, que está enlazada al lípido A.

40 La cadena O-específica se caracteriza por una variabilidad estructural extrema en diferentes especies. El lípido A es responsable de la actividad biológica descrita a continuación. La actividad biológica se modula mediante la variación del patrón de acilación del lípido A. Esta actividad varía desde un efecto antagonista, tal como ocurre con la mayoría de las variantes de LPS natural (por ejemplo, Salmonella serovar friedenau o Salmonella serovar abortus equi), al efecto antagonista de las variantes de LPS de microorganismos simbióticos con plantas o derivados sintéticos (C. Alexander y E. T. Rietschel, Biospektrum, Vol. 4, No. 5, pp. 275-281, 1999). Una descripción completa de LPS puede además encontrarse en A. Wiese, K. Brandenburg, U. Seydel, y S. Muller-Leoennies: The Dual Role of Lipopolysaccharide as Effector and Target Molecule (La función dual del lipopolisacárido como molécula diana y efectora). Biol. Chem., 380, pp. 767-784.

45 Los lipopolisacáridos están formados por bacterias gram-negativas, y son estimuladores muy potentes de la inmunidad natural. Se unen al receptor tipo toll 4 (TLR4)/ receptores CD14 en células mononucleares humanas (ver la Figura 1), e inducen la formación y secreción de las citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF α , MIF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 e IL-18, diversos factores estimuladores de colonias, varios mediadores lipídicos, y especies de oxígeno reducido.

55 Los lipopolisacáridos también activan la respuesta inmune no específica mediante estos mecanismos, y los microorganismos, virus, y células tumorales pueden eliminarse de una mejor manera como resultado de dicha

respuesta. Los fenómenos tales como inflamación, fiebre y sepsis son inducidos por la producción de citoquinas inducida por LPS y mediadores lipídicos. Debido al efecto tóxico del LPS en la sepsis, los LPS agonistas se denominan también endotoxinas.

5 En otros modos de realización, el activador de pan-quinasa es un activador TLR4. Otros activadores del receptor de la tirosina quinasa de superficie pueden ser utilizados en la invención para estimular otras vías en monocitos, por ejemplo el GM-CSF para activar la vía JAK/STAT en monocitos de sangre periférica, o agonistas tales como IL-4 para activar la vía de JAK/STAT en monocitos de sangre periférica.

10 Los tiempos de incubación y temperaturas óptimos para la etapa de preparación de cada muestra puede determinarse fácilmente utilizando experimentación de rutina. En al menos un modo de realización, la activación mediante el activador de pan-quinasa se realiza durante aproximadamente 1 a 10 minutos. Durante este periodo, pueden monitorizarse las proteínas de señalización de la vía de transducción de señales de activación temprana. Por ejemplo, como se demuestra en los siguientes ejemplos, la activación de ERK se puede medir dentro de un periodo de 2 minutos de la exposición al activador de pan-quinasa. Otras proteínas de señalización de la vía de transducción de señales de activación, alcanzan saturación dentro de un periodo de aproximadamente 15 minutos desde la exposición al activador de pan-quinasa.

15 En otros modos de realización, la activación por el activador de pan-quinasa se realiza durante un periodo mayor a aproximadamente 30 minutos. Durante este periodo, se pueden monitorizar las proteínas de señalización de vías de transducción de señales de activación tardía. Por ejemplo, como se demuestra en los siguientes ejemplos, la señalización de la S6 ribosómica comienza a alcanzar su punto más alto en algún momento después de 30 minutos de exposición al activador de pan-quinasa.

Métodos de conservación y desenmascamiento

25 En un modo de realización, la invención proporciona un método para la preparación de una muestra biológica para la medición de epítomos de proteínas que conserva los epítomos de las proteínas intracelulares para su posterior detección. El método abarca una etapa de conservación (fijación) que incluye poner en contacto dicha muestra con un conservante (fijador), en una cantidad para alcanzar una concentración final suficiente para entrecruzar proteínas, lípidos, y moléculas de ácido nucleico; una etapa de detergente que abarca la adición de un detergente a la muestra biológica, en una cantidad para alcanzar una concentración final suficiente para lisar cualquier glóbulo rojo que se encuentre presente en la muestra y permeabilizar los glóbulos blancos; y una etapa de marcado, en donde la muestra se pone en contacto con un agente de unión detectable específico para uno o más epítomos. Métodos específicos se describen en la solicitud de patente estadounidense, en tramitación junto con la presente, con N° 10/928,570.

En la medida en que la muestra no contenga glóbulos rojos, es decir, que la muestra haya sido fraccionada previamente, se entiende que la etapa de lisis no es necesaria.

35 En un modo de realización, la invención proporciona un método para la preparación de una muestra biológica para la medición de epítomos de proteínas que conserva los epítomos de las proteínas de la vía de señal para su posterior detección. El método abarca una etapa de conservación (fijación) que incluye poner en contacto la muestra con un conservante (fijador), en una cantidad para alcanzar una concentración final suficiente para entrecruzar proteínas, lípidos y moléculas de ácido nucleico. La concentración de conservante (fijador) puede encontrarse entre aproximadamente un 0,1 por ciento y aproximadamente un veinte por ciento, entre 0,5 por ciento y aproximadamente 15 por ciento; entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 10 por ciento, entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 8 por ciento, entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 4 por ciento, entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 2 por ciento. El conservante (fijador) puede ser añadido en una solución concentrada, o bien en una forma diluida para lograr la concentración deseada. El conservante (fijador) puede ser cualquier agente adecuado deseado por el usuario, por ejemplo, aldehído, formaldehído, o paraformaldehído, o formalina.

40 El método de la invención para preparar una muestra biológica para la medición de epítomos de proteínas, que conserva los epítomos de las proteínas intracelulares para su posterior detección, además comprende una etapa de detergente, en donde el detergente se añade en una cantidad para conseguir una concentración final suficiente para lisar cualquier glóbulo rojo presente y permeabilizar glóbulos blancos. La concentración de detergente puede ser seleccionada por el usuario en base a una variedad de condiciones, y puede encontrarse en un rango de entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 10 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 8 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 7 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 6 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 5 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 4 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 3 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 2 por ciento; entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 1 por ciento.

El detergente puede seleccionarse en base a una variedad de factores y puede ser un detergente iónico o no iónico. Los detergentes se seleccionan de manera preferente de entre detergentes no iónicos. Un detergente preferente en la actualidad es el octilfenol etoxilado, al que se hace referencia por su nombre comercial de Triton X-100 (Sigma T9284). En modos de realización preferentes, el método se lleva a la práctica con Triton X-100. Los detergentes adecuados para los métodos de la invención pueden permeabilizar células y mantener la integridad del epítipo de superficie. Entre los detergentes iónicos que se consideran de utilidad en la invención se incluyen además el octilfenoxipoli(etileno)etanol, disponible en el ámbito comercial como Igepal® CA-630 (Sigma N-6507), o Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma), Brij-58, y alcohol alcoxilado lineal, disponible en el ámbito comercial como Plufarac® A-38 (BASF Corp) o Plufarac® A-39 (BASF Corp).

En poblaciones de células complejas tales como, por ejemplo, sangre periférica no diluida, aspirado de médula ósea, y líquido peritoneal, puede ser útil distinguir los sub-conjuntos de células mediante marcadores de superficie y detectar la tinción del fosfo-epítipo intracelular en un procedimiento. Los métodos proporcionados por la presente invención para preparar un glóbulo rojo que contenga una muestra biológica para la medición de los epítipos de proteínas que conservan epítipos de proteínas intracelulares para su posterior detección, son susceptibles de ser utilizados para combinar la detección del epítipo intracelular con la detección de los epítipos de la superficie celular. En el método proporcionado por la invención, tanto los epítipos intracelulares como los extracelulares pueden permanecer intactos para permitir su posterior medición mediante análisis citométrico. Por ejemplo, la detección de la superficie de los marcadores de monocitos habituales que incluyen, por ejemplo, CD14 puede combinarse con la detección del epítipo intracelular.

En un modo de realización adicional, el método abarca una etapa adicional en alcohol que incluye poner en contacto la muestra biológica con alcohol en una cantidad para lograr una concentración final suficiente para desenmascarar los epítipos celulares que se pierden debido al entrecruzamiento durante la etapa de fijación. Tal como se describe en la presente patente, la etapa de alcohol puede conservar la mayoría de los epítipos extracelulares y pueden ser ajustados por el usuario en cuanto a duración de la incubación, temperatura y concentración dependiendo de los epítipos que van a ser conservados.

Se puede seleccionar fácilmente una concentración de alcohol final en base a otras variables que incluyen, por ejemplo, el tiempo de incubación, la temperatura y los epítipos en particular seleccionados como diana para el desenmascarado y la medición. La concentración final de alcohol puede encontrarse entre aproximadamente un 25 por ciento y aproximadamente un 75 por ciento, entre aproximadamente un 30 por ciento y aproximadamente un 70 por ciento, entre aproximadamente un 35 por ciento y aproximadamente un 65 por ciento, entre aproximadamente un 40 por ciento y aproximadamente un 60 por ciento, entre aproximadamente un 45 por ciento y aproximadamente un 55 por ciento. El alcohol puede adicionalmente seleccionarse del grupo que consiste en etanol y metanol. Si se desea, la acetona puede ser sustituida por alcohol en la etapa de alcohol. La muestra puede ponerse en contacto con alcohol o acetona a una temperatura de, por ejemplo, aproximadamente -30 grados Celsius, aproximadamente -20 grados Celsius, aproximadamente -10 grados Celsius, aproximadamente -5 grados Celsius, aproximadamente 0 grados Celsius, aproximadamente 4 grados Celsius, aproximadamente 6 grados Celsius, aproximadamente 8 grados Celsius, o cualquier otra temperatura que facilite el desenmascaramiento de los epítipos intracelulares sin reducir la actividad de los epítipos de la superficie celular.

Moléculas de captura y otros agentes de la invención

En un modo de realización de la invención, la proteína de las vías de transducción de señales se activa para propagar una señal. Los niveles de proteínas de las vías de transducción de señales se determinan generalmente utilizando moléculas de captura. Tal como se utiliza en la presente patente, el término "molécula de captura" hace referencia a cualquier molécula o complejo de moléculas capaz de unirse a una proteína de las vías de transducción de señales de la invención bajo condiciones adecuadas. Por tanto, una molécula de captura, incluye cualquier molécula, por ejemplo, una proteína, molécula orgánica pequeña, carbohidratos (incluyendo polisacáridos), polinucleótido, lípidos, etc. La selección de aquellas condiciones se conoce bien, además de las técnicas para variar o modificar las condiciones de unión. Por ejemplo, se conoce bien que la temperatura, pH y tiempo de incubación todos juegan un papel en la unión. En general, la unión tiene lugar con suficiente especificidad para excluir la unión significativa a más de un ligando. En algunas realizaciones de la invención, la molécula de captura es un anticuerpo o ligando que se une a un fragmento o análogo del mismo. La molécula de captura puede además ser otras proteínas o ácidos nucleicos, o partes o análogos de los mismos, que se unen a la proteína de vías de transducción de señales en la práctica de ciertos modos de realización de la invención.

En modos de realización preferentes, las moléculas de captura son anticuerpos, especialmente anticuerpos monoclonales. El término anticuerpo tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y a partes activas de las moléculas de inmunoglobulina (Ig). Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, policlonales mono específicos, mimica molecular de anticuerpos, quiméricos, de cadena única, fragmentos de Fab, Fab' y F(ab')₂, Fv, y una genoteca de expresión de Fab. En general, una molécula de anticuerpo obtenida a partir de humanos hace referencia a cualquiera de las clases de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases

presentan sub-clases además, tales como IgG1, IgG2, y otras. Más aún, en humanos, la cadena liviana puede ser una cadena kappa o una cadena lambda. La referencia realizada en la presente patente a anticuerpos incluye una referencia a todas esas clases, subclases y tipos de especies de anticuerpos.

5 Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo pueden realizar la función de antígenos de unión. Tal como se utiliza en la presente patente "fragmentos de unión al antígeno" incluye, pero no se limita a: (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único anticuerpo; (iv) el fragmento que consiste en un dominio V_H ; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos $F(ab')_2$; (vii) moléculas de Fv de cadena única (scFv), en donde un dominio V_H y un dominio V_L se enlazan mediante un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988)); (viii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) diacuerpos, fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (WO94/13804; P. Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)).

15 Las moléculas de captura de la invención pueden comprender un marcador fluorescente. Por marcador fluorescente se debe entender una molécula que puede detectarse directamente (es decir, un marcador primario) o indirectamente (es decir, un marcador secundario); por ejemplo, un marcador puede ser visualizado y/o medido o identificado de otro modo, de manera que su presencia o ausencia pueda conocerse. Un compuesto puede ser directa o indirectamente conjugado con un marcador que proporciona una señal que pueda detectarse, por ejemplo sustancias fluorescentes, enzimas, anticuerpos, partículas como por ejemplo partículas magnéticas, sustancias quimioluminiscentes, o moléculas de unión específica, etc. Las moléculas de unión específica incluyen pares, tales como biotina y estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Los marcadores incluyen, pero no se limitan a, marcadores y enzimas fluorescentes.

25 En general, los marcadores pueden ser coloreados o ser colorantes o fracciones luminiscentes; y también sus ligandos. Los marcadores pueden además incluir enzimas (peroxidasa de rábano, etc.) y partículas magnéticas. En un modo de realización determinado, el marcador de detección es un marcador primario. Un marcador primario es un marcador que puede ser detectado directamente, tal como por ejemplo un fluoróforo.

En ciertos modos de realización, los marcadores incluyen cromóforos o fósforos pero son, de manera preferente, colorantes o fracciones fluorescentes. Los fluoróforos pueden ser fluoróforos de "pequeñas moléculas", o fluoróforos proteicos.

30 Por marcador fluorescente se entiende cualquier molécula que pueda ser detectada a través de sus propiedades fluorescentes inherentes. Marcadores fluorescentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metil-cumarinas, pireno, verde de malaquita, estilbena, amarillo Lucifer, Cascade BlueTM, rojo texas, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Rojo 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Rojo 705 y Verde Oregón. Colorantes ópticos adecuados se describen en el 1996 Molecular Probes Handbook por Richard P. Haugland (Manual de Sondas Moleculares, año 1996), incorporado en la presente patente a modo de referencia. Entre los marcadores fluorescentes adecuados se incluyen, sin limitarse a, proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés; Chalfie et al., Science 263(5148):802-805 (1994); y EGP; Clontech--Número de Acceso de Genbank U55762), proteína fluorescente azul (BFP, por sus siglas en inglés; 1. Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8º Piso, Montreal (Quebec) Canadá H3H 1J9; 2. Stauber, R. H. Biotechniques 24(3):462-471 (1998); 3. Heim, R. y Tsien, R. Y. Curr. Biol. 6:178-182 (1996)), proteína fluorescente amarilla mejorada (EYFP, por sus siglas en inglés; 1. Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Calif. 94303), luciferasa (Ichiki et al., J. Immunol. 150 (12):5408-5417 (1993)), O-galactosidasa (Nolan et al., Proc Natl Acad Sci USA 85(8):2603-2607 (1988)) y Renilla WO 92/15673; WO 95/07463; WO 98/14605; WO 98/26277; WO 99/49019; patente estadounidense N° 5,292,658; patente estadounidense N° 5,418,155; patente estadounidense N° 5,683,888; patente estadounidense N° 5,741,668; patente estadounidense N° 5,777,079; patente estadounidense N° 5,804,387; patente estadounidense N° 5,874,304; patente estadounidense N° 5,876,995; y patente estadounidense N° 5,925,558). Todas las referencias citadas anteriormente se incorporan en la presente patente a modo de referencia.

50 Marcadores adicionales para su utilización en la presente invención incluyen: colorantes Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Azul Cascada, Amarillo Cascada y R-ficoeritrina (PE) (Molecular Probes) (Eugene, Oreg.), FITC, Rodamina, y rojo Texas (Pierce, Rockford, Ill.), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, Pa.). Los protocolos de conjugado en tándem para Cy5PE, Cy5.5PE, Cy7PE, Cy5.5APC, Cy7APC se conocen en el arte. La cuantificación de la conjugación con la sonda fluorescente puede ser evaluada para determinar el grado de marcado y los protocolos que incluyen las propiedades espectrales de los colorantes se conocen en el arte.

55 En otro modo de realización, el marcador es una GFP y, en al menos algunos modos de realización, una GFP de las especies renilla, ptilosarcus o aequorea.

En un determinado modo de realización, se utiliza un marcador detectable secundario. Un marcador secundario es un marcador que se detecta de forma indirecta; por ejemplo, un marcador secundario puede unirse o reaccionar con un marcador primario para su detección, puede actuar sobre un producto adicional para generar un marcador primario (por ejemplo, enzimas), etc. Los marcadores secundarios incluyen, pero no se limitan a, un marcador del par de ligandos; fracciones modificables químicamente; inhibidores de la nucleasa, enzimas tales como la peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalinas, luciferasas, etc.

En un determinado modo de realización, el marcador secundario es un par de ligando. Por ejemplo, el marcador puede ser un hapteno o antígeno, que se unirá a su ligando. Por ejemplo, pares de ligandos adecuados incluyen, pero no se limitan a: antígenos (tales como proteínas (incluyendo péptidos) y pequeñas moléculas) y anticuerpos (incluyendo fragmentos de los mismos (FABs, etc.)); proteínas y pequeñas moléculas, incluyendo biotina/estreptavidina; enzimas y sustratos o inhibidores; otras pares de interacción proteína-proteína; receptores-ligandos; y carbohidratos y sus ligandos. Pares de proteínas de unión ácido nucleico-ácido nucleico son también de utilidad. Pares de ligandos adecuados incluyen, pero no se limitan a, biotina (o imino-biotina) y estreptavidina, digeoxinina y Abs, y reactivos Prolinx™.

En un determinado modo de realización, el par de ligandos de unión comprende un antígeno y un anticuerpo que se unirán de forma específica al antígeno. Por "unirse de forma específica" en la presente patente se entiende que los ligandos se unen con especificidad suficiente para diferenciar entre el par y otros componentes o contaminantes del sistema. La unión debería ser suficiente para permanecer unidos bajo las condiciones del ensayo, incluyendo etapas de lavado para eliminar la unión no específica. En algunas realizaciones, las constantes de disociación del par será menor que aproximadamente 10^{-4} - 10^{-6} M⁻¹, siendo preferente menos de aproximadamente 10^{-5} a 10^{-9} M⁻¹, y donde menos de aproximadamente 10^{-7} - 10^{-9} M⁻¹ resulta particularmente preferente.

En un determinado modo de realización, el marcador secundario es una fracción químicamente modificable. En este modo de realización, los marcadores que comprenden grupos funcionales reactivos se incorporan a la molécula que va a ser marcada. El grupo funcional puede entonces ser posteriormente marcado (por ejemplo, antes o después del ensayo) con un marcador primario. Entre los grupos funcionales adecuados se incluyen, sin limitarse a, los grupos amino, grupos carboxi, grupos maleimida, grupos oxo y grupos tiol, siendo particularmente preferentes los grupos amino y los grupos tiol. Por ejemplo, los marcadores primarios que contienen grupos amino pueden unirse a marcadores secundarios que comprenden grupos amino, por ejemplo utilizando conectores como se conocen en el arte; por ejemplo, conectores homo- o hetero- bifuncionales se conocen bien (ver el catálogo de 1994 Pierce Chemical Company, sección técnica sobre entrecruzadores, páginas 155-200).

En ciertas realizaciones, se utilizan marcadores fluorescentes múltiples con las moléculas de captura de la presente invención. En un modo de realización preferente, se utilizan al menos dos marcadores fluorescentes los cuales son miembros de un par de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET, por sus siglas en inglés).

La técnica FRET consiste en un fenómeno conocido en el arte en donde la excitación de un colorante fluorescente se transfiere a otro sin la emisión de un fotón. Un par de FRET consiste en un fluoróforo donador y un fluoróforo aceptor. El espectro de emisión de fluorescencia del donador y el espectro de absorción de fluorescencia del aceptor deben superponerse, y las dos moléculas deben encontrarse en proximidad cercana. La distancia entre donador y aceptor a la que el 50% de los donadores se desactivan (transfieren energía al aceptor), se define mediante la distancia de Forster (R₀), que suele ser 10-100 Å. Pueden detectarse cambios en el espectro de emisión de fluorescencia que comprenden pares FRET, indicando cambios en el número de pares que están en proximidad cercana (es decir, en un rango de 100 Å entre sí). Este resultado se obtendrá habitualmente a partir de la unión o disociación de dos moléculas, una de las cuales está marcada con un donador FRET y la otra está marcada con un aceptor FRET, en donde tal unión lleva a una situación de proximidad cercana al par FRET. La unión de tales moléculas dará como resultado una emisión de fluorescencia aumentada del aceptor y/o una extinción de la emisión de fluorescencia del donador.

Los pares FRET (donador/aceptor) útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, EDANS/fluoresceína, IAEDANS/fluoresceína, fluoresceína/tetrametilrodamina, fluoresceína/LC Rojo 640, fluoresceína/Cy 5, fluoresceína/Cy 5,5, y fluoresceína/LC Rojo 705.

En otro aspecto de la FRET, puede utilizarse una molécula donadora fluorescente y una molécula aceptora no fluorescente ("extintor"). En esta solicitud, la emisión fluorescente del donador aumentará cuando el extintor se desplace de la posición de proximidad cercana con el donador y la emisión fluorescente disminuya cuando el extintor sea puesto en proximidad cercana al donador. Entre los extintores de utilidad se incluyen, pero sin limitarse a, TAMRA, DABCYL, QSY 7, y QSY 33. Entre los pares de utilidad donador/extintor se incluyen, pero sin limitarse a, EDANS/DABCYL, rojo Texas/DABCYL, BODIPY/DABCYL, amarillo Lucifer/DABCYL, cumarina/DABCYL, y colorante fluoresceína/QSY 7.

La extinción de la fluorescencia y la FRET permite la monitorización de la unión de moléculas marcadas a lo largo del tiempo, proporcionando información continua con respecto al transcurso de tiempo de las reacciones de unión.

Se pueden determinar cambios en el grado de FRET en función del cambio en la relación de la cantidad de fluorescencia de las fracciones donadoras yceptoras, un proceso que se denomina "cálculo fraccional" (ratioing). Los cambios en la cantidad absoluta de sustrato, intensidad de la excitación, y turbidez u otra absorción de fondo en la muestra, en la longitud de onda de la excitación, afectan a las intensidades de la fluorescencia tanto del donador como del aceptor aproximadamente en paralelo. Por lo tanto, la relación de las dos intensidades de emisión es una medida más robusta y preferente de corte que cualquier intensidad por separado.

El sistema logométrico indicador de fluorescencia descrito en la presente patente presenta ventajas significativas sobre los indicadores existentes para el análisis de la integración de proteínas, ya que permite la detección sensible y el aislamiento de células vivas únicas tanto de expresión como de no expresión. En un determinado modo de realización, este sistema de ensayo utiliza un sustrato fluorescente no tóxico y no polar que se carga fácilmente, y queda después atrapado en el interior de la célula. La modificación del sustrato fluorescente por una proteína afín produce un cambio en la emisión fluorescente al convertirse el sustrato en producto. Dado que la lectura del indicador es logométrica, es única entre los ensayos con la proteína indicadora ya que controla variables tales como la cantidad de sustrato cargado en células individuales. La lectura intracelular estable, fácilmente detectable, elimina la necesidad de establecer líneas celulares clonales previamente al análisis de la expresión. El sistema y otros sistemas análogos de clasificación de flujo pueden utilizarse para aislar células que presentan una agrupación del elemento receptor en particular y/o perfil de activación de depósitos de millones de células viables.

La conjugación de anticuerpos puede realizarse utilizando procedimientos estándar (drmr.com.abcon) o mediante la utilización de kits de entrecruzamiento de proteína-proteína/proteína-colorante de Molecular Probes (Eugene, Oreg.). La conjugación de la fracción del marcador con la molécula de detección, tal como por ejemplo un anticuerpo, es un procedimiento manipulativo estándar en técnicas de inmunoensayo. Ver, por ejemplo, O'Sullivan et al., 1981, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," (Métodos para la preparación de conjugados enzima-anticuerpo para su uso en inmunoensayos con enzimas), en *Methods in Enzymology* (Métodos en Enzimología), Langone y Van Vunakis, Eds., Vol. 73 (Academic Press, New York, N.Y.), pp. 147-166. Se encuentran disponibles métodos convencionales para unir de forma covalente la fracción del marcador a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, agentes de acoplamiento tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada, y similares, pueden ser utilizados para marcar anticuerpos con los marcadores fluorescentes, quimioluminiscentes y enzimáticos descritos anteriormente. Ver, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 3,940,475 (fluorimetría) y la patente de EE.UU 3,645,090 (enzimas); Hunter et al., *Nature*, 144:945 (1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014-1021 (1974); Pain et al., *J. Immunol Methods*, 40:219-230 (1981); y Nygren J., *Histochem. and Cytochem.*, 30:407-412 (1982). Los marcadores fluorescentes o quimioluminiscentes pueden utilizarse para aumentar la amplificación y sensibilidad hasta aproximadamente 5-10 pg/ml, o más.

En los modos de realización de la invención las moléculas de captura son específicas para la activación. Los métodos y composiciones de la presente invención pueden ser utilizados para detectar cualquier isoforma en particular del elemento receptor en una muestra que sea antigénicamente detectable y antigénicamente distinguible de otras isoformas del elemento receptor que se encuentra presente en la muestra. Por ejemplo, tal como se ha demostrado y descrito en la presente patente (ver, por ejemplo, los Ejemplos), las moléculas de captura específicas para el estado de activación de la presente invención pueden utilizarse en los presentes métodos para identificar cascadas de señalización distintivas de un sub-conjunto o una sub-población de poblaciones de células complejas; y el ordenamiento de la activación de proteínas (por ejemplo, activación de la quinasa) en jerarquías de señalización potencial. Además, en los métodos de la presente invención, el uso de la citometría de flujo, en particular la citometría de flujo policromática, permite el análisis multidimensional y la evaluación funcional de la vía de señalización en células únicas.

Tal como se utiliza en la presente patente, los términos "molécula de captura específica del estado de activación" o "molécula de estado de activación", o sus equivalentes gramaticales hacen referencia a una molécula de captura (es decir, un anticuerpo) que se une de forma específica a un antígeno correspondiente y específico. En ciertos modos de realización, el antígeno correspondiente y específico es una isoforma específica de un elemento receptor activable. También de forma preferente, la unión del anticuerpo específico del estado de activación es indicativo de un estado de activación específico de un elemento receptor activable específico.

En ciertos modos de realización, la unión de una molécula de captura específica del estado de activación a una isoforma correspondiente de un elemento receptor activable, es indicativa de la identidad del elemento receptor activable y del estado de activación del elemento receptor activable.

En un determinado modo de realización, la molécula de captura específica del estado de activación es un péptido que comprende una estructura de reconocimiento que se une a una estructura diana en un elemento receptor activable. Una variedad de estructuras de reconocimiento se conocen bien en el arte y pueden ser realizadas utilizando métodos conocidos en el arte, que incluyen métodos mediante genotecas de expresión en fago (phage display) (ver por ejemplo, Gururaja et al., *Chem. Biol.* (2000) 7:515-27; Houimel et al., *Eur. J. Immunol.* (2001) 31: 3535-45; Cochran et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123: 625-32; Houimel et al., *Int. J. Cancer* (2001) 92:748-55). En

un determinado modo de realización, la molécula de captura específica del estado de activación comprende la siguiente estructura de reconocimiento: SKVILFE—asa peptídica aleatoria—SKVIKFE. Las moléculas de captura que tienen estructuras de reconocimiento de este tipo pueden unirse con afinidad elevada a estructuras diana específicas. Además, los fluoróforos pueden acoplarse a dichas moléculas de captura para su uso en los métodos de la presente invención.

Una variedad de estructuras de reconocimiento se conocen en el arte (por ejemplo, Cochran et al., J. Am. Chem. Soc. (2001) 123:625-32; Boer et al., Blood (2002) 100:467-73) y pueden ser producidas utilizando métodos conocidos en el arte (ver por ejemplo, Boer et al., Blood (2002) 100:467-73; Gualillo et al., Mol. Cell. Endocrinol. (2002) 190:83-9), incluyendo por ejemplo métodos de química combinatoria para la producción de estructuras de reconocimiento tales como polímeros con afinidad por una estructura diana en una proteína activable (ver por ejemplo, Barn et al., J. Comb. Chem. (2001) 3:534-41; Ju et al., Biotechnol. (1999) 64:232-9). En otro modo de realización, la molécula de captura específica del estado de activación es una proteína que solamente se une a una isoforma de un elemento receptor activable específico que se encuentra fosforilado y no se une a la isoforma de dicho elemento receptor activable cuando no se encuentra fosforilado está no fosforilado. En otro modo de realización, la molécula de captura específica del estado de activación es una proteína que únicamente se une a una isoforma de un elemento receptor activable que es intracelular y no extracelular, o viceversa.

Se han producido anticuerpos, muchos de los cuales se encuentran disponibles en el ámbito comercial, que se unen específicamente a la isoforma fosforilada de una proteína, pero no se unen específicamente a la isoforma no fosforilada de una proteína. Muchos de tales anticuerpos, se han producido para el estudio de proteínas de transducción de señales que son fosforiladas de forma reversible. En particular, se han producido muchos anticuerpos de ese tipo que se unen específicamente a isoformas activadas y fosforiladas de proteínas quinasas, y en ocasiones se hace referencia a las mismas en la presente patente como anticuerpos de estado de activación de quinasas o sus equivalentes gramaticales. En ciertos modos de realización, entre los anticuerpos para su utilización en la presente invención se incluyen: anticuerpos contra la fosfo-p44/42 MAP quinasa, (Thr202/Tyr204), fosfo-TYK2 (Tyr1054/1055), fosfo-p38 MAP quinasa (Thr180/Tyr182), sustrato de fosfo-PKC-PAN, sustrato de fosfo-PKA, fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), fosfo-tirosina (P-tyr-100), p44/42 MAPK, fosfo-MEK1/2 (Ser217/221), fosfo-p90RSK (Ser381), p38 MAPK, JNK/SAPK, fosfo-Raf1 (Ser259), fosfoElk-1 (Ser383), fosfo-CREB (Ser133), fosfoSEK1/MKK4 (Thr261), fosfo-Jun (Ser 63), fosfoMKK3/MKK6 (Ser189/207), AKT, fosfo FKHR, FKHR, fosfo-Gsk3 alp21, pAFX, PARP, BAD, BADser 112, BADser 136, fosfo-BADser 155, p27, p21, cFLIP, antiMYC, p53, NFkB, Ikk α , Ikk β , combinación de fosfo-tirosina y fosfotreonina. En ciertos modos de realización de la presente invención, estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales. En ciertos modos de realización, estos anticuerpos se utilizan en varias combinaciones.

Se pueden también utilizar en la presente invención moléculas de captura en estado de no activación, es decir, moléculas de captura de control. En un determinado modo de realización, las moléculas de captura en estado de no activación se unen a epítopos en formas tanto activadas como no activadas de una proteína de vías de transducción de señales. Las moléculas de captura de ese tipo se pueden utilizar para determinar la cantidad de proteínas de las vías de transducción de señales no activadas más las activadas que hay en una muestra. En otro modo de realización, las moléculas de captura en estado de no activación se unen a epítopos presentes en formas no activadas de un receptor pero ausentes en formas activadas de una proteína de vías de transducción de señales. Tales moléculas de captura pueden ser utilizadas para determinar la cantidad de receptor no activado en una muestra. Ambos tipos de moléculas de captura en estado de no activación pueden utilizarse para determinar si un cambio en la cantidad de receptor en estado de activación, por ejemplo de muestras de antes y después del tratamiento con un agente bioactivo candidato, coincide con los cambios en la cantidad de receptor en estado de no activación. Por ejemplo, tales moléculas de captura pueden utilizarse para determinar si un aumento en la proteína de vías de transducción de señales activada se debe a la activación de una proteína de vías de transducción de señales en estado de no activación, o se debe a un aumento en la expresión de la proteína, o a ambos. En otros modos de realización, la molécula de captura de control se une a un epítipo de la célula activable que no se ve afectado por la activación de la vía de transducción de señalización.

El uso de moléculas de captura de control se ejemplifica en mayor detalle en la solicitud de EE.UU. en tramitación junto con la presente con N° 11/276,948. De manera preferente, la molécula de captura de control se une a la misma célula a la que se une la molécula de captura específica en estado de activación, incluso en un epítipo que es inactivado por el activador de la pan-quinasa. De ese modo, por ejemplo, en ciertos modos de realización de la presente invención, el activador de la pan-quinasa activa las vías de transducción de señales en monocitos. Los anticuerpos específicos en estado de activación detectan la activación de las vías de señalización en el monocito. La CD14, que no responde al activador de pan-quinasa, podría entonces ser utilizado como la diana para las moléculas de captura de control. El ensayo sería capaz de detectar entonces los monocitos en la muestra y cuáles de ellos han sido activados. Se entiende que la molécula de captura de control podría unirse a una célula diferente en al menos ciertos modos de realización. De ese modo, a modo de ejemplo, cuando se monitoriza la activación de monocitos, podrían utilizarse moléculas de captura específicas anti-linfocito como la molécula de captura de control.

En la mayoría de las realizaciones, las moléculas de captura de control se añaden al “mismo tubo” que las moléculas de captura específicas en estado de activación. Por “el mismo tubo” debe entenderse que se trata del mismo recipiente de reacción, ya sea éste un recipiente, un tubo, o un pocillo en una placa de microtitulación o similar. La molécula de captura de control difiere, de ese modo, de los controles de isótopos tradicionales en que proporciona una valoración más certera de la fluorescencia de referencia de la célula de ensayo. Por ejemplo, en aquellos modos de realización en los que la célula que se está evaluando es un monocito, la molécula de captura de control se puede unir a la CD14, que es un marcador de monocitos independiente de activación. Esto permitirá el establecimiento de la fluorescencia de referencia de la población de monocitos. Cuando esas células se activan entonces y la fluorescencia cambia, el grado de cambio es, por consiguiente, una medida más certera del aumento en la fluorescencia. La utilización de estos controles, por lo tanto, proporciona una mejor manera de reducir la fluorescencia de fondo de las células que se están evaluando. Debido a que los estados de fosforilación de las proteínas han resultado, tradicionalmente, difíciles de identificar, y mucho menos cuantificar, el control del fondo es importante para la sensibilidad total de los métodos de la presente invención.

Por tanto, en al menos ciertos modos de realización, el cambio en la intensidad de fluorescencia observado a través de la presente invención es, en general, un aumento de 10 veces o más en la intensidad de fluorescencia media. En otros modos de realización el cambio en la intensidad de fluorescencia es un aumento de 20 veces o más, 30 veces o más, e incluso 50 a 100 veces o más en la intensidad de fluorescencia.

Inmunoensayo

Los sistemas de ensayo que utilizan una molécula de captura y un marcador fluorescente para cuantificar las moléculas capturadas se conocen bien. Entre los ejemplos de inmunoensayos de utilidad en la invención se incluyen, pero sin limitarse a los mismos, el ensayo por fluorominiscencia (FLA), ensayo por quimioluminiscencia (CA), ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y similares. Ver, por ejemplo, Johnstone and Thorpe, 1996, En: Blackwell, *Immunochemistry in Practice*, 3rd ed. (Blackwell Publishing, Malden, Mass.); Ausbul et al., eds., 2003, *Current Protocols in Molecular Biology* (, Wiley & Sons (Hoboken, N.J.); Ghindilis et al., eds., 2003, *Immunoassay Methods and Protocols*, (Blackwell Publishing, Malden, Mass.); y Publicación de Patente de EE.UU. N° 20030044865. El inmunoensayo puede ser un ensayo en fase sólida, un ensayo en fase líquida, y similares.

El inmunoensayo, en un modo de realización, puede diseñarse para un instrumento automatizado, de alto rendimiento. Por ejemplo, la familia de aparatos Access® por Beckman Coulter, Inc. son instrumentos muy adecuados para efectuar los métodos de la invención. El sistema de inmunoensayo Access® permite una rápida producción de hasta 100 ensayos por hora a través del uso de un cargador de vasija de reacción que tiene capacidad para un procesamiento continuo de muestras de hasta 3 horas.

En un determinado modo de realización, la citometría de flujo se utiliza para detectar fluorescencia. Otros métodos de detección de fluorescencia pueden también utilizarse, por ejemplo, métodos de punto cuántico (Quantum dot) (ver, por ejemplo, Goldman et al., *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124: 6378-82; Pathak et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2001) 123: 4103-4; y Remade et al., *Proc. Natl. Sci. USA* (2000) 18:553-8).

Para un inmunoensayo en fase sólida, la molécula de captura (por ejemplo, un mAb) se inmoviliza a un soporte sólido. La inmovilización, de manera convencional, se logra mediante la insolubilización de la molécula de captura bien antes del procedimiento de ensayo, como por ejemplo por adsorción en una matriz o superficie insoluble en agua (Patente de EE.UU. N° 3,720,760), o por acoplamiento covalente o no covalente (por ejemplo, utilizando entrecruzamiento con glutaraldehído o carbodiimida, con o sin activación previa del soporte con, por ejemplo, ácido nítrico y un agente reductor tal como se encuentra descrito en la Patente de EE.UU. N° 3,645,852 o en Rotmans et al.; *J. Immunol. Methods*, 57:87-98 (1983)), o bien después, por ejemplo, por inmunoprecipitación.

La fase sólida utilizada para la inmovilización puede ser cualquier soporte o vehículo que sea esencialmente insoluble en agua y útil en ensayos inmunométricos, que incluyen soportes en forma de, por ejemplo, superficies, partículas, matrices porosas, etc. Ejemplos de soportes utilizados comúnmente incluyen láminas pequeñas, geles SEPHADEX®, policloruro de vinilo, granulados plásticos, y placas de ensayo o tubos de ensayo fabricados de polietileno, polipropileno, poliestireno, y similares, incluyendo placas de microtitulación de 96 pocillos, además de material particulado tal como papel de filtro, agarosa, dextrana entrecruzada, y otros polisacáridos. Las moléculas de captura pueden además inmovilizarse en un sustrato, tal como granulado polimérico, metal coloidal o partículas de óxido de hierro. Los granulados pueden ser de plástico, de vidrio, o de cualquier otro material adecuado, habitualmente en un rango de 1-20 micrones. Las partículas de metal coloidal, tales como las partículas de oro y plata coloidal y partículas de óxido de hierro, pueden prepararse utilizando muchos procedimientos diferentes disponibles en el ámbito comercial o de cualquier forma conocidos por los expertos en el arte.

De manera alternativa, las matrices insolubles en agua reactivas, tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; y 4,330,440 pueden ser utilizados para la inmovilización de la molécula de captura. En un

modo de realización, las moléculas de captura inmovilizadas se recubren en una placa de microtitulación, y en otro modo de realización la fase sólida es una placa de microtitulación multipocillo que puede analizar diversas muestras de una sola vez.

5 La fase sólida se recubre con las moléculas de captura tal como se ha definido anteriormente, que pueden estar ligados mediante una interacción covalente o no covalente o un ligamiento físico, según se desee. Las técnicas para el acoplamiento incluyen aquellas descritas en la Patente de EE.UU. Nº 4,376,110 y las referencias citadas en la misma. En caso de que sea una interacción covalente, la placa u otra fase sólida se incuba con un agente de entrecruzamiento junto con las moléculas de captura bajo condiciones bien conocidas en la literatura.

10 Los agentes de entrecruzamiento utilizados comúnmente para el acoplamiento de moléculas de captura al sustrato en fase sólida incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano; glutaraldehído; ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluyen disuccinimidil ésteres tales como 3,3'-ditiobis(succinimidil-propionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes tales como metil-3-((p-azidofenil)-ditio)propioimidato producen productos intermedios fotoactivables que son capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz.

15 Las placas recubiertas se tratan entonces de forma habitual con un agente bloqueante que se une a, y satura, de manera no específica los sitios de unión no ocupados para evitar la unión no deseada del ligando libre a los sitios con exceso en los pocillos de la placa. Ejemplos de agentes bloqueantes apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, gelatina, albúmina de suero bovino, albúmina de huevo, caseína, y leche sin grasa. El tratamiento bloqueante tiene lugar habitualmente bajo condiciones de temperaturas ambiente durante aproximadamente 1-4
20 horas, habitualmente aproximadamente 1,5 a 3 horas.

La cantidad de molécula de captura empleada es suficientemente grande para proporcionar una buena señal en comparación con los estándar de calibración, pero no se encuentra en general en un exceso molar en comparación con el nivel máximo esperado de la proteína de vías de transducción de señales que es de interés en la muestra. Para suficiente sensibilidad la cantidad de muestra de ensayo debería añadirse de tal manera que las moléculas
25 de captura inmovilizadas se encuentran en exceso molar con respecto a la concentración molar máxima del analito libre de interés anticipado en la muestra de ensayo después de la dilución adecuada de la muestra.

En general, las condiciones para la incubación de la muestra y de la molécula de captura inmovilizada se seleccionan para maximizar la sensibilidad analítica del ensayo para minimizar la disociación, y para asegurar que el
30 suficiente analito de interés que se encuentra presente en la muestra se une con la molécula de captura inmovilizada. Se entiende que la selección de las condiciones de reacción óptimas requiere, por lo general, únicamente una rutina de experimentación. La incubación se logra a temperaturas bastante constantes, que se encuentran en un rango desde aproximadamente 0 °C hasta 40 °C, en general a o cerca de la temperatura ambiente. El tiempo para la incubación no es, en general, mayor de aproximadamente 10 horas. La duración de la
35 incubación puede ser mayor si un inhibidor de la proteasa se añade para evitar que las proteasas en la muestra de ensayo degraden las proteínas de interés de vías de transducción de señales.

Métodos de la presente invención

La presente invención proporciona métodos para determinar el estado de activación de una proteína de vías de transducción de señales en una muestra que comprende poner en contacto los epítomos intracelulares
40 desenmascarados de los leucocitos conservados en la muestra con una pluralidad de moléculas de captura marcadas de forma fluorescente, la pluralidad de moléculas de captura comprende al menos dos moléculas de captura diferentes capaces de unirse al estado activado de al menos los dos epítomos intracelulares desenmascarados diferentes de los leucocitos activados, conservados en la muestra. En este modo de realización, los leucocitos conservados, activados capturados por la molécula de captura se detectan utilizando un de los
45 formatos de inmunoensayos descritos con anterioridad. En ciertos modos de realización, la detección de fluorescencia detecta las moléculas de captura marcadas enlazadas al estado activado de los epítomos intracelulares desenmascarados. Los leucocitos conservados se detectan de forma similar. Por lo tanto, en ciertos modos de realización, el inmunoensayo detecta la fluorescencia del leucocito conservado capturado por la unión de la molécula de captura de control.

50 Cuando se utilizan componentes marcados fluorescentes en los métodos y composiciones de la presente invención, se reconocerá que pueden utilizarse para la práctica de la invención diferentes tipos de sistemas de monitorización, por ejemplo, sistemas de citometría de flujo. En algunos modos de realización, se utilizan los sistemas de citometría de flujo o sistemas dedicados a cribado de alto rendimiento, por ejemplo placas de microtitulación de 96 pocillos o más. Se conocen bien en el arte métodos para realizar ensayos sobre materiales fluorescentes y se encuentran descritos en, por ejemplo, Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983); Herman, B., Resonance energy transfer microscopy, in: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture,
55 Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, ed. Taylor, D. L. & Wang, Y.-L., San Diego: Academic Press (1989), pp. 219-

243; Turro, N.J., *Modern Molecular Photochemistry*, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Col, Inc. (1978), pp. 296-361.

5 La fluorescencia en una muestra puede ser medida utilizando un fluorímetro. En general, la radiación de excitación, procedente de una fuente de excitación que presenta una primera longitud de onda, atraviesa la óptica de excitación. La óptica de excitación causa que la propia radiación de excitación excite la muestra. En respuesta, las proteínas fluorescentes en la muestra emiten radiación que tiene una longitud de onda que es diferente de la longitud de onda de la excitación. La óptica de captación recoge entonces la emisión procedente de la muestra. El dispositivo puede incluir un controlador de temperatura para mantener la muestra a una temperatura específica mientras se está escaneando. De acuerdo a un modo de realización, una etapa de traslación de múltiples ejes desplaza una placa de microtitulación que sostiene una pluralidad de muestras, para situar diferentes pocillos para ser expuestos. La etapa de traslación de múltiples ejes, el controlador de temperatura, el elemento de auto focalización, y la electrónica asociada con la captación de imágenes y datos, pueden manejarse mediante un ordenador digital programado adecuadamente. El ordenador además puede transformar los datos recogidos durante el ensayo en otro formato para su presentación.

15 En otro modo de realización, las moléculas de captura tales como anticuerpos, son inmovilizadas utilizando granulados análogos a aquellos conocidos y utilizados para la estandarización en la citometría de flujo. El acoplamiento de una multiplicidad de moléculas de captura específicas del estado de activación al granulado puede ser realizado mediante los métodos conocidos en el arte y/o descritos en la presente patente. Un granulado conjugado de ese tipo puede ponerse en contacto con una muestra, de manera preferente un extracto celular, bajo condiciones que permiten una multiplicidad de elementos receptores activados, si se encontraran presentes, para unirse a la multiplicidad de moléculas de captura inmovilizadas. Una segunda multiplicidad de moléculas de captura que comprenden moléculas de captura en estado de no activación que se encuentran exclusivamente marcadas pueden añadirse al complejo anticuerpo específico en estado de activación inmovilizado-receptor activado y el granulado puede ser clasificado por citometría de flujo en base a la presencia de cada marcador, en donde la presencia del marcador indica la unión de la segunda molécula de captura correspondiente y la presencia del correspondiente receptor activado.

Una vez que la fluorescencia de las moléculas de captura específicas en estado activado y las moléculas de captura de control hayan sido detectadas, se puede comparar su fluorescencia. Los términos "establecer una relación" o "comparar", o sus equivalentes gramaticales, están destinados a ser utilizados de manera intercambiable, a menos que el contexto en particular connote un significado diferente. Por establecer una relación/comparar se entiende comparar, de cualquier forma, el rendimiento y/o resultados de un primer análisis con el rendimiento y/o resultados de un segundo análisis. Por ejemplo, tal como se describe en mayor detalle a continuación, el nivel de la actividad de MAPK en una muestra que haya sido sometida al inhibidor de MAPK, difiere del nivel de la actividad en una muestra que no ha sido sometida al mismo inhibidor. Identificando un nivel de actividad en particular, la actividad de la proteína MAPK puede actuar como un indicador o como un elemento de pronóstico para una condición o enfermedad específica, "estableciendo una relación" por tanto, de la actividad con el estado de la condición o enfermedad. En las enfermedades y condiciones discutidas en otras partes de la presente patente, la enfermedad o condición puede estar caracterizada por la carencia de una respuesta de activación cuando se exponen al activador de la pan-quinasa. De forma similar, tal como se describe en otras partes de la presente patente, la receptividad de la enfermedad o condición al tratamiento puede ser identificada mediante la evaluación de la fluorescencia de las diversas moléculas de captura para identificar la re-aparición de una respuesta de activación de la pan-quinasa.

En otros modos de realización, la intensidad de fluorescencia media de la proteína de vías de transducción de señales activada puede ser evaluada contra la intensidad de fluorescencia media de una proteína de vías de transducción de señales no activada. El propósito en estas evaluaciones es discernir si una diferencia existe entre la señal de fluorescencia generada por la muestra de referencia activada contra la inactivada, o la activada contra la estandarizada. En general, estas evaluaciones constituyen una segunda etapa de correlación. En al menos algunos modos de realización, la muestra de referencia inactivada es un segundo alícuota de la muestra.

La muestra de referencia estandarizada es, en un modo de realización, un valor establecido por el fabricante de la fluorescencia esperada de una muestra celular inactivada tratada bajo condiciones altamente reproducibles. Estos tipos de valores de referencia estandarizados están pensados para ser utilizados como sustitutos para los valores que el usuario final lograría si se ejecutara una muestra inactivada paralela. Un propósito de estos valores de referencia estandarizados es lograr eficacia en cuanto al trabajo para el usuario final, en cuanto a que el usuario final no necesitaría ejecutar una muestra paralela, y el trabajo y los costes del reactivo asociado con la preparación y ejecución de una muestra paralela. Los fabricantes de kits reactivos de diagnóstico, tales como Beckman Coulter, están bastante habituados a preparar valores de referencia estandarizados para sus reactivos y kits.

El inmunoensayo de la presente invención proporciona un grado más elevado de especificidad que los presentes ensayos descritos en el arte. La especificidad se proporciona a través del uso de controles enérgicos. De manera específica, en el arte previo, se midió el porcentaje de células positivas para un marcador(es) en particular en una célula específica. En general, las células se colorearon utilizando un control de isótopos de anticuerpos. La señal de

las proteínas de la vía MAPK, por ejemplo, se medirían entonces y se describirían como la actividad menos la señal de fondo. Debido a que la fuerza de muchas señales es baja, además de naturaleza transitoria, los altos niveles de fondo no permiten la aplicación de los ensayos en un entorno clínico. En la presente invención, los epítomos intracelulares para las proteínas son desenmascarados utilizando los tratamientos con detergente y alcohol. La especificidad se obtiene entonces utilizando estándares internos y perfiles compuestos de varias actividades. En un modo de realización, los monocitos se identifican por citometría de flujo, utilizando dispersión lateral y directa acoplada a la expresión del marcador CD14 de la superficie celular. En una realización adicional, la actividad de las proteínas MAPK se mide en estimulación contra no estimulación con LPS. Esta actividad puede ser descrita como una relación de la actividad de las células estimuladas sobre las no estimuladas, o, una relación señal-ruido (S/N). Esta relación proporciona una medida de referencia certera y ayuda en la reducción de los niveles de fondo inaceptablemente altos de los ensayos del arte previo.

Tal como se ha indicado previamente, una relación S/N mayor que aproximadamente 10 puede lograrse a través del uso de los métodos de la presente invención. En otros modos de realización, una relación S/N mayor que aproximadamente 20, mayor que 30, e incluso mayor que aproximadamente 50 puede lograrse a través de la aplicación de los métodos descritos en la presente patente.

Se debe entender que en la mayoría de las realizaciones de la presente invención, las relaciones S/N pueden variar dependiendo de la proteína de vía de señalización que se esté evaluando. Por tanto, algunas proteínas de las vías de señalización producen de forma inherente mayor ruido que otras. Por tanto, en ciertos modos de realización, una primera proteína de vía de señalización alcanza, por ejemplo, una relación S/N de aproximadamente 10 y una segunda proteína de señalización alcanza, por ejemplo, una relación S/N de aproximadamente 20.

Tal como se encuentra ejemplificado anteriormente, ciertos tipos de cáncer o enfermedades se caracterizan por la activación sistémica de las proteínas de señalización de las vías de transducción de señales. Cuando estas muestras anormales se caracterizan por los métodos de la presente invención, el ensayo no es capaz de discernir una diferencia en la fluorescencia entre la muestra naïve y la muestra que ha sido activada por el activador de la pan-quinasa. De hecho, las proteínas de señalización de vías de transducción de señales se encuentran ya bajo un estado de activación.

En ciertos modos de realización, la invención hace referencia a métodos de monitorización de la actividad de los inhibidores de proteínas de las vías de transducción de señales que han sido administrados a pacientes. Cuando estos pacientes se encuentran recibiendo un inhibidor de proteínas de las vías de transducción de señales, el inhibidor cierra o reduce el estado de activación de las proteínas de las vías de transducción de señales. Normalmente, estos inhibidores titulan a partir de la muestra del paciente o de ensayo en el tiempo y son re-administradas para mantener su efectividad/eficacia. En un momento justo previo a la re-administración del inhibidor, puede obtenerse la muestra de un paciente (o en el caso de un ensayo con un cultivo tisular- una muestra celular), y los leucocitos en dicha muestra puede ser sometida a ensayo utilizando los ensayos de la presente invención. Si el inhibidor está resultando efectivo para tratar la enfermedad o condición, el ensayo revelará la re-aparición de la respuesta de la pan-quinasa observada en una muestra normal, es decir, una muestra no enferma. Por tanto, la presente invención, en al menos un modo de realización, proporciona un análisis de sangre sensible para monitorizar la progresión del tratamiento clínico de enfermedades o condiciones caracterizadas por una activación de la proteína de vías de transducción de señales anormal.

Se entiende que ciertas enfermedades o condiciones asociadas a la transducción de señales incluyen la inflamación, fiebre, sepsis, cáncer, diabetes, y fallo cardíaco. En modos de realización preferentes de la presente invención la condición es sepsis.

Cuando un paciente presenta sepsis, las bacterias que causan la condición de sepsis secretan endotoxinas que conducen a la sobre estimulación de las proteínas de las vías de transducción de señales. Esta sobre estimulación conduce, en algunos casos, a la muerte del paciente. En el modo de realización de la presente invención que está relacionado con la detección y/o monitorización de la sepsis, la muestra del paciente con sepsis no responderá al activador de la pan-quinasa siguiendo los protocolos resumidos en general en la presente invención. Por tanto, en al menos un modo de realización de la presente invención, la sepsis puede detectarse mediante la monitorización para una ausencia de respuesta a la activación de la pan-quinasa.

La sepsis es en general tratada mediante la administración de agentes antibióticos al paciente séptico. Como una manera de monitorizar el progreso clínico del paciente con sepsis, los ensayos de la presente invención pueden ser utilizados para monitorizar la recurrencia de la respuesta de la activación de la pan-quinasa. Por tanto, para un paciente séptico que previamente no mostró una activación de proteínas de las vías de transducción de señales significativa por el activador de pan-quinasa, se entiende que el régimen con antibióticos está comenzando a tratar al sepsis subyacente cuando la muestra del paciente comienza a demostrar la activación de la proteína de vías de transducción de señales mediante el activador de pan-quinasa.

En al menos ciertos modos de realización, el método comprende simultáneamente la determinación de la presencia de isoformas activadas de una multiplicidad de proteínas de las vías de transducción de señales utilizando una multiplicidad de anticuerpos que se unen de forma específica a isoformas activas, fosforiladas de la multiplicidad de elementos receptores.

5 La presente invención proporciona formas adicionales para determinar la activación de la quinasa. Por tanto se conocen sustratos que son específicamente reconocidos por las proteínas quinasas y fosforilados. Los anticuerpos que se unen de forma específica a tales sustratos fosforilados, pero no se unen a dichos sustratos no fosforilados (anticuerpos de fosfo-sustrato), pueden utilizarse para determinar la presencia de quinasa activada en una muestra.

10 Al utilizar ciertos modos de realización de la invención, niveles modificados de la actividad de proteínas de las vías de transducción de señales pueden ser asociados con el pronóstico de muchas enfermedades o condiciones que incluyen, pero no se limitan a, condiciones alérgicas, inflamatorias, autoinmune o neoplásica.

15 En un cierto modo de realización, la presente invención proporciona métodos para determinar el perfil del estado de activación de una proteína de vías de transducción de señales para una única célula. Los métodos comprenden clasificar células mediante citometría de flujo en base al estado de activación de al menos dos proteínas de las vías de transducción de señales. Se utilizan anticuerpos específicos en estado de activación para clasificar células en base al estado de activación de la proteína de vías de transducción de señales.

20 En un cierto modo de realización, se proporcionan métodos para la determinación del perfil de estado de activación de una proteína de vías de transducción de señales para una célula única. Los métodos comprenden proporcionar una población de células y clasificar la población de células por citometría de flujo. En ciertos modos de realización, las células se encuentran separadas en base al estado de activación de al menos dos proteínas de las vías de transducción de señales. En un determinado modo de realización, una multiplicidad de anticuerpos en estado de activación de proteínas de las vías de transducción de señales, se utilizan para determinar simultáneamente el estado de activación de una multiplicidad de proteínas de las vías de transducción de señales.

25 En un determinado modo de realización, la clasificación de células por citometría de flujo en base al estado de activación de al menos dos proteínas de las vías de transducción de señales se combina con una determinación de otros datos de salida legibles de la citometría de flujo, tales como la presencia de marcadores de superficie, granularidad y tamaño de célula para proporcionar una correlación entre el estado de activación de una multiplicidad de elementos receptores y otras cualidades celulares medibles mediante citometría de flujo para células únicas. En ciertos modos de realización, la presencia del marcador de superficie celular CD14 se utiliza para identificar poblaciones de monocitos.

30 La presente invención puede además utilizarse para determinar la presencia de sub-conjuntos celulares, en base a la activación de elementos receptores correlacionados dentro de mezclas de complejos celulares tales como células mononucleares de sangre periférica. Estos sub-conjuntos pueden representar diferentes estados de diferenciación o activación o diferentes linajes de células o sub-linajes.

35 Se reconocerá además que resulta deseable utilizar una población de células homogénea para estudiar la transducción, de manera que las variaciones en la señalización entre células no enmascaren cualitativa y cuantitativamente los eventos de transducción de señales. El principal sistema homogéneo es el sistema de líneas monocelulares. La presente invención proporciona métodos para el análisis de transducción de señales en células únicas, donde el estado activado del elemento receptor de transducción de señales implicado es antigénicamente distinguible del estado no activado.

40 Estos métodos además prevén la identificación de las distintas cascadas de señalización tanto para las condiciones artificiales como las estimuladoras en poblaciones de células complejas, tal como las células mononucleares de sangre periférica, o linfocitos de memoria o naïve.

45 Los métodos proporcionados en la presente patente pueden también implicar el uso de inhibidores específicos de elementos receptores en particular. Los métodos proporcionados en la presente patente pueden además implicar el uso de otros inhibidores farmacológicos de vías de señalización. Estos inhibidores pueden ser utilizados como controles para asegurar que los anticuerpos se unan específicamente a las isoformas activadas de los elementos receptores. Por ejemplo, un inhibidor de una proteína de vías de transducción de señales que se sabe fosforila y activa una quinasa, puede utilizarse para inhibir la fosforilación de la quinasa y examinar si un anticuerpo específicamente reconoce una isoforma fosforilada de la quinasa. De manera alternativa, los inhibidores pueden utilizarse para hibridar las vías de señalización y correlaciones en la actividad proteica, en particular en células únicas.

50 En ciertos modos de realización, la actividad de la proteína de vías de transducción de señales se determina utilizando dos o más anticuerpos específicos en estado de activación. En realizaciones donde dos o más anticuerpos

se utilizan, los anticuerpos son marcados de forma exclusiva, lo que significa que un primer anticuerpo en estado de activación que reconoce una primera proteína de vías de transducción de señales comprende un primer marcador, y un segundo anticuerpo en estado de activación que reconoce una segunda proteína de vías de transducción de señales comprende un segundo marcador, en donde el primer y segundo marcador son detectables y distinguibles, haciendo que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo queden marcados de forma exclusiva. El uso de una segunda proteína de vías de transducción de señales se utiliza como un control interno para confirmar la especificidad de la actividad medida.

En ciertos modos de realización, la actividad de la proteína de vías de transducción de señales se determina utilizando tres o más moléculas de captura específica en estado de activación, incluyendo específicamente anticuerpos monoclonales. En modos de realización donde tres o más moléculas de captura se utilizan, los anticuerpos se marcan de forma exclusiva, lo que significa que una primera molécula de captura en estado de activación que reconoce una primera proteína de vías de transducción de señales comprende un primer marcador, una segunda molécula de captura en estado de activación que reconoce una segunda proteína de vías de transducción de señales comprende un segundo marcador, y una tercera molécula de captura en estado de activación que reconoce una tercera proteína de vías de transducción de señales comprende un tercer marcador, en donde los marcadores primero, segundo y tercero se pueden detectar y distinguir, haciendo que la primera molécula de captura, la segunda molécula de captura y la tercera molécula de captura queden marcadas de forma exclusiva.

Se entiende que en la evaluación de más de una, preferentemente más de dos, y en algunos modos de realización más de tres diferentes proteínas de las vías de transducción de señales, los métodos de la presente invención proporcionan un mayor grado de sensibilidad a la respuesta de activación de una célula a un activador de pan-quinasa. Las vías de señalización celular son sistemas complejos, y la utilización de múltiples moléculas de captura para capturar los estados de activación de múltiples proteínas de las vías de señalización permite al usuario diseñar sistemas para medir y monitorizar de forma precisa el estado de activación de estas vías de señalización, que incluyen específicamente su respuesta a los regímenes de tratamiento diseñados para controlar el estado de activación de las proteínas de señalización. Por ejemplo, en el contexto de los experimentos de activación con LPS descritos a continuación, ciertas proteínas de señalización respondieron de forma diferente en el tiempo a la activación con LPS. Por tanto, mediante la monitorización de un panel de proteínas en estado de activación, el sistema puede evaluar de forma mucho más fiable el estado de activación de una célula en respuesta a una enfermedad o condición y, de ese modo, el estado de activación de dichas células que están siendo tratadas para esa enfermedad o condición.

Aunque se encuentran ejemplificados en la presente patente con respecto a fosfo-proteínas/epítomos intracelulares, los métodos de la invención se pueden aplicar igualmente para la preparación de muestras destinadas a medir otras modificaciones post-trasduccionales que incluyen, por ejemplo, ubiquitinización, glicosilación, metilación, acetilación, palmitoilación, o interacciones proteína-proteína. Por tanto, la invención permite la detección de epítomos no fosforilados de una variedad de proteínas en el interior de la célula, lo que expande la utilidad de los métodos de la invención adicionalmente. Los agentes de unión marcados pueden seleccionarse en base a los eventos celulares en concreto que van a ser estudiados. Los métodos proporcionados por la invención permiten la examinación de vías en transcurso de tiempo detallados y de maneras específicas para la vía que no han estado disponibles previamente. Aunque los diversos epítomos intracelulares puedan seleccionarse para un análisis de citometría de flujo, se debe entender que el usuario puede optimizar y adaptar el método proporcionado en la presente patente para el epítomo específico en cuestión, teniendo en cuenta factores entre los que se incluyen, por ejemplo, la localización, conformación/estructura, accesibilidad por parte de los anticuerpos, y estabilidad del epítomo. Los métodos proporcionados en la presente patente se pueden aplicar, en general, a análisis de citometría multiparamétrica y multicolor.

En otro modo de realización, las células de control no se estimulan con LPS. Estas células no estimuladas se utilizan para proporcionar una relación del nivel de señal entre células estimuladas y no estimuladas. En un modo de realización, la relación es la diferencia en la intensidad de fluorescencia media entre las células estimuladas con LPS y las no estimuladas. En otro modo de realización, las células de control son monocitos no estimulados. En un modo de realización adicional, la relación es la diferencia en la intensidad de fluorescencia media entre los monocitos estimulados con LPS contra los monocitos no estimulados. Al utilizar controles internos energéticos, las diferencias en la actividad de las proteínas MAPK resultan fácilmente visibles, lo que permite la correlación entre la actividad y una enfermedad o condición en particular.

Compuestos de ensayo

Se obtienen agentes candidatos a partir de una amplia variedad de fuentes, como podrá apreciarse por los expertos en el arte, que incluyen genotecas de compuestos sintéticos o naturales. Tal como podrá apreciarse por aquellas personas expertas en el arte, la presente invención proporciona un método rápido y sencillo para el cribado de cualquier genoteca de moduladores candidatos, incluyendo la gran variedad de genotecas del tipo química combinatoria conocidas.

En un determinado modo de realización, se proporciona un método para el cribado de un agente bioactivo capaz de inhibir la proteína de vías de transducción de señales, el cual comprende poner en contacto una célula con un agente bioactivo putativo y determinar la activación de la proteína de vías de transducción de señales en dicha célula mediante citometría de flujo.

5 Por “agente putativo”, “inhibidor putativo”, “agente terapéutico putativo”, o “inhibidor de vías de transducción de señales putativo” se entiende cualquier molécula, por ejemplo, proteína, molécula orgánica pequeña, carbohidratos (incluyendo polisacáridos), polinucleótido, lípidos, etc. que esté siendo evaluado por su habilidad para afectar a la señalización de una proteína de vías de transducción de señales.

10 En general, una pluralidad de mezclas de ensayo puede ejecutarse en paralelo con diferentes concentraciones del agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. De forma habitual, una de estas concentraciones puede ser adecuada como control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección. Además, pueden utilizarse controles positivos.

15 En al menos un modo de realización, al efectividad de un inhibidor putativo de la quinasa se mide exponiendo una muestra que contiene leucocitos al inhibidor putativo de la quinasa, activando las proteínas activables de al menos una vía de transducción de señales en la muestra que contiene leucocitos al exponer la muestra a un activador de la pan-quinasa, conservando la muestra de sangre, y desenmascarando los epítomos intracelulares de los leucocitos conservados en la muestra. El estado de activación de las proteínas de las vías de transducción de señales en la muestra, se determina entonces poniendo en contacto los epítomos intracelulares desenmascarados de los leucocitos conservados en la muestra, con una pluralidad de moléculas de captura marcadas de forma que se puedan detectar, donde la pluralidad de moléculas de captura comprende al menos dos moléculas de captura diferentes capaces de unirse al estado activado de los dos epítomos diferentes intracelulares desenmascarados de los leucocitos conservados y activados en la muestra de sangre. En este modo de realización, los leucocitos conservados, activados se detectan utilizando uno de los formatos de inmunoensayo descritos con anterioridad. En ciertos modos de realización, la detección de fluorescencia detecta las moléculas de captura marcadas enlazadas al estado de los epítomos intracelulares desenmascarados. Los leucocitos conservados se detectan de forma similar. Por lo tanto, en ciertos modos de realización, el inmunoensayo detecta la fluorescencia del leucocito capturado por la unión de la molécula de captura de control.

En este modo de realización, en general, una muestra paralela se procesa bajo las mismas condiciones, pero sin supuesta exposición al inhibidor putativo de la quinasa.

30 La fluorescencia detectada de las células expuestas al inhibidor putativo puede entonces compararse con la fluorescencia de la muestra naïve, es decir, la muestra que no fue expuesta al inhibidor putativo. En el caso de una muestra naïve, el activador de la pan-quinasa activará las proteínas de las vías de transducción de señales disponibles y se observará un cambio en la fluorescencia. Sin embargo, en la medida en que el inhibidor putativo sea efectivo en afectar a la activación de la proteína de vías de transducción de señales, no se observará el cambio en la fluorescencia o bien el cambio será menos espectacular que el observado en la muestra de control. El grado en el cual el cambio en la fluorescencia se apague o disminuya, está en correlación con la efectividad de dicho inhibidor putativo.

40 Se debe entender que en el modo de realización que se acaba de describir, la utilización de la muestra de control paralela es opcional. La actividad del inhibidor putativo de la quinasa puede ser monitorizada utilizando controles apropiados en un formato de ensayo de un tubo.

45 En al menos un modo de realización, la presente invención proporciona métodos para identificar inhibidores putativos que afectan a la activación de la vía de S6 ribosómica. Como se muestra en el Ejemplo 1, la activación de la vía de S6 ribosómica requiere de la inhibición tanto de las proteínas de señalización ERK como de las PI3K. Por tanto, en la medida en que el ensayo está destinado a someter a prueba el inhibidor de ERK putativa, la muestra es expuesta al inhibidor putativo y a un inhibidor de PI3K conocido, tal como LY294002. El inhibidor putativo es efectivo a la hora de afectar a la señalización de ERK cuando se observa que la activación de la S6 ribosómica ha sido afectada. De forma similar, en la medida que el ensayo está pensado para someter a prueba al inhibidor putativo de PI3K, la muestra es expuesta al inhibidor putativo ya un inhibidor conocido de ERK, tal como U0126. El inhibidor putativo es efectivo a la hora de afectar a la señalización de la PI3K cuando se observa que la activación de la S6 ribosómica ha resultado afectada.

Se entiende, por supuesto, que la activación de la vía de la S6 ribosómica no es la única vía que requiere de la inhibición de múltiples elementos de vía para apagar toda la vía. Otros ejemplos de este tipo son conocidos por aquellas personas expertas en el área, y se pretende que sean abarcados por la presente invención.

55 Los agentes putativos abarcan numerosas clases de sustancias químicas. En un cierto modo de realización, los agentes candidatos son pequeñas moléculas. En otro modo de realización, los agentes candidatos son moléculas

orgánicas, que comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, e incluyen habitualmente al menos un grupo amino, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, de forma preferente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos a menudo comprenden estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más grupos químicos funcionales.

En un determinado modo de realización, los agentes putativos son compuestos sintéticos, tal como se ha descrito anteriormente en conexión con las proteínas de las vías de transducción de señales. Una ventaja del presente método es que no es necesario caracterizar el agente putativo previamente al ensayo. Al utilizar los métodos de la presente invención, cualquier agente candidato puede ser cribado por su habilidad para modular (por ejemplo, aumentar o disminuir) la actividad de una proteína activable.

De manera alternativa, un determinado modo de realización utiliza genotecas de compuestos naturales, como agentes putativos, en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales que se encuentran disponibles o que se producen fácilmente. De manera adicional, genotecas y compuestos producidos de forma sintética o naturales, son modificados fácilmente a través de medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Agentes farmacológicos conocidos pueden estar sujetos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, incluyendo modificaciones enzimáticas, para producir análogos estructurales.

En un determinado modo de realización, los agentes putativos son péptidos con aproximadamente desde 2 hasta aproximadamente 50 aminoácidos, siendo preferente con desde aproximadamente 5 a aproximadamente 30 aminoácidos, y siendo particularmente preferente con desde aproximadamente 8 a aproximadamente 20 aminoácidos. Los péptidos pueden ser digestiones de las proteínas naturales como se ha descrito anteriormente, péptidos aleatorios, o péptidos aleatorios "sesgados". Por "aleatorios" se entiende que cada ácido nucleico y péptido consiste esencialmente en nucleótidos y aminoácidos aleatorios, respectivamente. Debido a que, por lo general, estos péptidos aleatorios (o ácidos nucleicos, analizados a continuación) se sintetizan químicamente, pueden incorporar cualquier nucleótido o aminoácido en cualquier posición. El proceso sintético puede estar diseñado para generar proteínas o ácidos nucleicos aleatorizados, para permitir la formación de todas o la mayoría de las posibles combinaciones en cuanto a la longitud de la secuencia, formando de ese modo una genoteca de agentes proteicos bioactivos candidatos aleatorizados.

La genoteca debe proporcionar una población suficientemente diversa en cuanto a la estructura de agentes aleatorizados para influir en un rango de diversidad suficiente probabilísticamente, para permitir la interacción con una proteína activable en particular. Por consiguiente, una genoteca de interacción debe ser lo suficientemente grande para que al menos uno de sus miembros pueda tener una estructura que interactúe con una proteína que se puede activar u otros componentes específicos de la vía de transducción de señales que implica a la proteína activable. Aunque resulta difícil calibrar el tamaño absoluto de una genoteca de interacción que se requiere, la naturaleza proporciona un indicio con la respuesta inmune: una diversidad de 10^7 - 10^8 de diferentes anticuerpos proporciona al menos una combinación con suficiente afinidad para interactuar con los antígenos más potenciales enfrentados por un organismo. Técnicas de selección in vitro publicadas también han mostrado que un tamaño de genoteca de 10^7 - 10^8 es suficiente para encontrar estructuras con afinidad hacia una diana. Una genoteca de todas las combinaciones de un péptido con de 7 a 20 aminoácidos de longitud, tal como se propone en general en la presente patente, presenta el potencial de codificar para un rango de 20^7 (10^9) a 20^{20} . De ese modo, con genotecas de 10^7 - 10^8 de moléculas diferentes, los presentes métodos permiten un sub-conjunto de "trabajo" de una genoteca de interacción teóricamente completa para 7 aminoácidos, y un sub-conjunto de conformaciones para la genoteca de 20^{20} . Por tanto, en un modo de realización preferente, al menos 10^6 , de manera preferente 10^7 , de manera más preferente al menos 10^8 y de la forma más preferente al menos 10^9 secuencias diferentes son simultáneamente analizadas en los métodos en cuestión. Los métodos preferentes maximizan el tamaño de la genoteca y su diversidad.

En un modo de realización, la genoteca es completamente aleatorizada, sin ninguna preferencia de secuencias o constantes en ninguna posición. En un determinado modo de realización, la genoteca es sesgada. Es decir, algunas posiciones dentro de la secuencia o se mantienen constantes, o bien se seleccionan a partir de un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, en un determinado modo de realización, los nucleótidos o residuos de aminoácidos son aleatorizados dentro de una clase definida, por ejemplo, de aminoácidos hidrófobos, de residuos hidrófilos, residuos estéricamente sesgados (ya sean pequeños o grandes), hacia la creación de cisteínas, para su entrecruzamiento, prolinas para dominios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas, o histidinas para sitios de fosforilación, etc., o a purinas, etc.

En un determinado modo de realización, la preferencia es hacia péptidos o ácidos nucleicos que interactúan con clases conocidas de moléculas. Por ejemplo, cuando el agente candidato es un péptido, se sabe que gran parte de la señalización intracelular se lleva a cabo a través de regiones cortas de proteínas que interactúan con otras proteínas a través de dominios de péptidos pequeños. Por ejemplo, se ha observado previamente que una región corta del dominio citoplasmático de la cubierta vírica del VIH-1 bloquea la acción de la calmodulina celular. Las regiones del dominio Fas citoplasmático, que muestra homología con mastoparín, un péptido procedente de una

toxina de las avispas, pueden limitarse a una región peptídica corta con funciones apoptóticas que inducen a muerte o funciones que inducen la proteína G. La magainina, un péptido natural derivado de *Xenopus*, puede presentar una potente actividad anti-tumoral y anti-micobriana. Se ha observado que los fragmentos péptidos cortos de una isoenzima de la proteína quinasa C (β PKC), bloquean la translocación nuclear de β PKC en ovocitos de *Xenopus* a continuación de la estimulación. Y, los péptidos cortos diana con SH-3 se han utilizado como pseudo-sustratos para la unión específica a proteínas con SH-3. Esta es por supuesto una pequeña lista de péptidos disponibles con actividad biológica, ya que la literatura es densa en esta área. Por tanto, existe un gran precedente para el potencial de pequeños péptidos para presentar actividad en las cascadas de señalización intracelulares. Además, los antagonistas de cualquier número de moléculas pueden ser utilizadas como la base de la aleatoriedad sesgada de los inhibidores candidatos también.

Por tanto, un número de moléculas o dominios de proteínas son adecuados como puntos de partida para la generación de inhibidores candidatos aleatorizados sesgados. Se conocen una gran cantidad de dominios de moléculas pequeñas, que confieren una función común, estructura o afinidad. Además, como puede apreciarse en el arte, las áreas de homología débil de aminoácidos pueden tener una fuerte homología estructural. Un número de estas moléculas, dominios, y/o secuencias consenso correspondientes, se conocen, incluyendo, pero sin limitarse a, dominios SH-2, dominios SH-3, pleckstrina, dominios de muerte, corte de la proteasa/sitios de reconocimiento, inhibidores enzimáticos, sustratos enzimáticos, y Traf.

En un determinado modo de realización, el inhibidor putativo es un polipéptido. En otro modo de realización, el polipéptido es un péptido cíclico que tiene al menos 4 a 20 aminoácidos. Además, en otro modo de realización, el polipéptido es un polipéptido catalíticamente inactivo. Ejemplos de plipéptidos catalíticamente inactivos incluyen, pero no se limitan a, proteínas activables catalíticamente inactivas y, de manera más específica quinasas inactivas catalíticamente (por ejemplo, PI3K) o caspasas. En un aspecto adicional, el agente de modulación candidato es un fragmento de un péptido de una proteína activable, en donde el fragmento del péptido comprende una secuencia de aminoácidos que es una sub-secuencia de la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la proteína activable.

Como podrá apreciarse, es posible cribar más de un tipo de agente candidato a la vez, por ejemplo, combinando los agentes putativos en los métodos de la presente invención. De este modo, la genoteca de agentes putativos utilizados puede incluir únicamente un tipo de agente (es decir, péptidos), o múltiples tipos (péptidos y agentes orgánicos).

Por el término combinar se entiende la combinación de los diversos componentes en una mezcla de reacción in vitro o en una célula in vivo, bajo condiciones que promueven una actividad que se puede detectar utilizando métodos conocidos o utilizando los métodos de la presente invención (por ejemplo, la unión de un anticuerpo a un antígeno correspondiente o una isoforma de una proteína activable, o un estado de activación de una proteína activable).

Los presentes ensayos son no limitativos

Se entiende que las etapas de los ensayos proporcionados en la presente invención pueden variar en su orden. También se entiende, sin embargo, que mientras que diversas opciones (de compuestos, propiedades seleccionadas o orden de las etapas) se proporcionan en la presente patente, cada una de las opciones también se proporcionan de forma individual, y cada una de ellas puede separarse de forma individual de las otras opciones proporcionadas en la presente patente. Más aún, se pretende incluir las etapas que resulten obvias y que sean conocidas en el arte por su capacidad de aumentar la sensibilidad del ensayo dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, pueden existir etapas de lavado adicionales, etapas de bloqueo, etc.

En un determinado modo de realización, la mezcla de reacción o células se encuentran contenidas en un pocillo de una placa de 96 pocillos o de otras placas multipocillo disponibles en el ámbito comercial. En un modo de realización alternativo, la mezcla de reacción o las células se encuentran en una máquina de citometría de flujo. Otras placas multipocillo útiles en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, placas de 384 pocillos y placas de 1536 pocillos. Aún así, otros recipientes para contener la mezcla de reacción o las células y que resultan de utilidad en la presente invención, resultarán evidentes.

La adición de de los componentes del ensayo para detectar el estado de activación o la actividad de la proteína de vías de transducción de señales, o la inhibición de dicho estado de activación o actividad, puede ser secuencial o en un orden o agrupamiento predeterminado bajo condiciones adecuadas para la actividad para la que se somete a ensayo. Tales condiciones se describen en la presente patente y se conocen en el arte.

En un determinado modo de realización, los métodos de la invención incluyen el uso de componentes de manipulación de líquidos. Los sistemas de manipulación de líquidos pueden incluir sistemas robóticos que comprenden cualquier cantidad de componentes. Además, cualquiera o todas las etapas resumidas en la presente

patente pueden ser automatizadas; de este modo, por ejemplo, los sistemas pueden ser completamente o parcialmente automatizados.

5 Como podrá apreciarse existe una gran variedad de componentes que pueden ser utilizados, incluyendo, pero sin limitarse a, uno o más brazos robóticos; máquinas manipuladoras de placas para la colocación de microplacas; máquinas manipuladoras de tapas o cubierta para retirar y reemplazar tapas para los pocillos en placas de contaminación no cruzada; conjuntos de puntas para la distribución de muestras con puntas desechables; conjuntos de puntas lavables para la distribución de muestras; bloques de carga de 96 pocillos; soportes para reactivos refrigerados; posiciones de las pipetas de las placas de microtitulación (opcionalmente refrigeradas); torres de apilado para placas y puntas; y sistemas informáticos.

10 Los sistemas completamente robóticos o microfluídicos incluyen la manipulación automatizada de líquidos, partículas, células, y organismos, incluyendo pipeteo de alto rendimiento para realizar todas las etapas de las aplicaciones de cribado. Esto incluye la manipulación de líquidos, partículas, células, y de organismos, tales como por ejemplo la aspiración, dispensación, mezclado, dilución, lavado, transferencias volumétricas precisas; recuperación, y eliminación de puntas de pipeta; y pipeteo repetitivo de volúmenes idénticos para dispensaciones múltiples a partir de una única aspiración de la muestra. Estas manipulaciones son transferencias libres de contaminación cruzada de líquidos, partículas, células, y organismos. Este instrumento realiza una replicación automatizada de muestras de microplacas a filtros, membranas, y/o placas secundarias, transferencias de alta densidad, diluciones en serie de placas completas, y funcionamiento de alta capacidad.

20 En un determinado modo de realización, se utilizan partículas, placas, cartuchos, tubos, partículas magnéticas químicamente derivadas, u otra matriz en fase sólida con especificidad a los componentes del ensayo. Las superficies de enlace de microplacas, tubos o cualquier matriz en fase sólida incluyen superficies no polares, superficies altamente polares, recubrimiento con dextrán modificado para promover el enlace covalente, recubrimiento de anticuerpos, medios de afinidad para unir proteínas o péptidos de fusión, proteínas fijas a la superficie tales como la proteína recombinante A o G, resinas o recubrimientos de nucleótidos, y otra matriz de afinidad resultan de utilidad en la presente invención.

25 En un determinado modo de realización, plataformas para placas multipocillo, multitubos, soportes, cartuchos, minitubos, placas de pocillos profundos, tubos de microfuga, crioviales, placas de pocillos cuadrados, filtros, chips, fibras ópticas, granulado, y otras matrices o plataforma en fase sólida con varios volúmenes se encuentran provistas en una plataforma modular ampliable para una capacidad adicional. Esta plataforma modular incluye un agitador orbital de velocidad variable, y plataformas de trabajo de múltiples posiciones para muestras de partida, dilución de muestra y reactivo, placas de ensayo, depósitos de muestra y reactivo, puntas de pipeta, y una estación de lavado activa.

35 En un determinado modo de realización, unos cabezales de pipeta intercambiables (sencillos o multicanal) con sondas magnéticas únicas o múltiples, sondas de afinidad, o bien unas pipetas manipulan robóticamente los líquidos, partículas, células, y organismos. Separadores o plataformas magnéticos de múltiples pocillos o múltiples tubos manipulan líquidos, partículas, células, y organismos en formatos de muestra únicos o múltiples.

40 Los compuestos identificados que utilizan el ensayo revelado son potencialmente útiles como terapia para muchos estados de enfermedad que incluyen condiciones de alergia, autoinmunidad y neoplásicas. La cantidad de tal(es) compuesto(s) será una cantidad que produzca el grado deseado de inhibición de una proteína de vías de transducción de señales, que se puede encontrar en general entre 0,001 y 10000 μM .

Ejemplos

Ejemplo 1: Protocolo para la activación por LPS de la señalización de MAPK en muestras de sangre entera

45 Se introdujeron 100 μl de sangre en el fondo de tubos de 12x75 mm. La sangre se retiró del lateral del tubo con borlas de algodón para eliminar la contaminación potencial de la muestra con células no fijadas. Se añadió 100 ng de polisacárido (LPS) a los tubos de activación (o un volumen igual de tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), a los tubos de control), y los tubos se colocaron en un baño de agua a 37 °C.

50 Después de diversos tiempos de incubación (por ejemplo, de 1 minuto a 60 minutos, el primer tubo se eliminó del incubador y se añadieron al tubo 65 μl de formaldehído al 10%. Los tubos se mezclaron y se colocaron en un soporte y se incubaron a temperatura ambiente. Después de exactamente una incubación de 10 minutos con formaldehído, se añadió a cada tubo un tampón de lisis/permeabilización de 1 ml (585 μl Triton X-100 10% de solución patrón a 500 ml con PBS. 0,11 65% Triton X-100 de solución a temperatura ambiente en la oscuridad y pre-calentada a 37 °C inmediatamente antes de su uso), se vortizó enérgicamente y se devolvió al soporte. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Se añadieron 2 ml de tampón de lavado frío (PBS (w/o Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) con un 4% de FBS, filtrado estéril (0,22 um filtro)) (a 4 °C). Todos los tubos se centrifugaron a 500 x g durante 4 minutos. Los tubos se retiraron de la cetrifugadora y el fluido sobrenadante se aspiró. Se añadió a cada tubo 1 ml de metanol frío (4 °C) al 50% y se vortizó. Todos los tubos fueron entonces incubados en hielo durante 10 minutos.

5 Los tubos se centrifugaron entonces a 500 X g durante 4 minutos y el líquido sobrenadante fue aspirado. Se añadió a cada tubo 2 ml de tampón de lavado frío (4 °C). Todos los tubos se centrifugaron a 500 X g durante 4 minutos. Los tubos se retiraron de la cetrifugadora y el fluido sobrenadante se aspiró.

10 Se añadieron los anticuerpos y el tampón de lavado frío a un volumen final de 100 µl y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un tampón de lavado frío de 2 ml fue añadido, mezclado y centrifugado. Las células fueron resuspendidas en 1 ml de tampón de lavado, se vortizaron y analizaron en el citómetro de flujo.

15 Al utilizar las técnicas descritas con anterioridad, se observó que la sangre entera no estimulada expresa niveles basales de dicersos miembros de la vía de MAPK, que incluyen la p38, SAPK/JNK, y ERK (Figura 2). Cuando muestras similares fueron incubadas con LPS, la activación de la vía MAPK fue espectacular en comparación con los controles no estimulados (Figura 3). Al utilizar los métodos de la invención, la cinética de la estimulación con LPS pudo ser continuada en el tiempo (Figuras 4-6). La ERK demuestra la activación más temprana mostrada en la presente patente 2 minutos después de la estimulación con LPS a 37 °C antes de la activación de JNK o p38 (Figura 4). Seis minutos después de la activación con LPS a 37 °C la activación inicial de ERK disminuye (Figura 5). En puntos de tiempo posteriores (~10 minutos) p38, JNK y ERK aumentan. Después de 60 minutos de la activación con LPS, la actividad de todas las 3 vías MAPK se reduce, pero no regresan a la línea de referencia (Figura 6). Si se añade LPS adicional, diferentes vías de quinasa MAP muestran patrones de respuesta específicos y característicos.

20 La estimulación con LPS también demostró los patrones de inhibición de fosforilación de la proteína S6 ribosómica (Figura 7). La fosforilación de la proteína S6 ribosómica ocurre en los aminoácidos Ser235, Ser240, Ser244, y Ser247. La inhibición de la fosforilación se observó a continuación de la adición tanto del inhibidor de la vía de ERK (por ejemplo, UO126) y un inhibidor de PI3K (por ejemplo LY294002), que muestra que tanto las vías ERK y Akt deben ser inhibidas para evitar la activación inducida por LPS de la proteína S6 ribosómica (Figura 8). Estos experimentos demuestran que la activación por LPS de la sangre entera proporciona una técnica rápida y práctica para monitorizar la activación de todas las 3 vías de MAPK, más PI3K (Akt) y NF Kappa B. En particular, esta aproximación proporciona un medio para medir la inhibición de estas vías tanto in vivo como in vitro mediante fármacos (por ejemplo, inhibidores dirigidos a moléculas de vías de señalización), y proporciona un medio para monitorizar la actividad funcional en monocitos (como una diana sustituta) en pacientes que reciben un tratamiento in vivo con inhibidores de vías de transducción de señales específicos.

Ejemplo 2: Ensayo de sepsis en base a citometría de flujo

35 En este estudio, se realizó una medición simultánea de cuatro diferentes fosfo-epítomos de señalización, que incluyen P-ERK, P-p38, quinasa MAP, P-SAPK (proteína quinasa activada por estrés), y proteína P-S6 ribosómica (una medición de síntesis de nuevos polipéptidos). Este ensayo empleó una medición del transcurso de tiempo de la activación por LPS, tanto en muestras de sangre entera "naïve", como en muestras de sangre entera expuesta previamente a la activación por LPS ("reactivada"). Este ensayo además empleó una aproximación de fijación y permeabilización descrita con anterioridad para medir tanto la superficie celular (CD14 para identificar monocitos) como fosfo-epítomos localizados de forma nuclear o citoplasmática (P-ERK, P-p38, P-SAPK, y P-S6). Este ensayo además empleó un control negativo interno para el análisis de los datos, apoyándose en poblaciones, más que en controles isotópicos, y mediciones de los cambios en la MFI (intensidad de fluorescencia media) más que en el porcentaje positivo.

Los resultados del estudio de cada marcador inividual se presenta más adelante, seguido por la utilidad mejorada de utilizar los marcadores y el método analítico empleado en el estudio.

45 P-ERK: Tal como se muestra en la Figura 9, en muestras normales (no expuestas previamente a LPS), el LPS induce una rápida activación de la quinasa ERK MAP, que se caracteriza por un pico anterior, una caída en P-ERK, y un segundo pico a los 10-15 minutos después de la estimulación con LPS. Este segundo pico de P-ERK tiene lugar al mismo tiempo que los niveles de P-p38 y P-SAPK alcanzan niveles máximos. Se cree que el primer pico de P-ERK se conduce a través de la PI3 quinasa, mientras que el segundo probablemente a través de la vía clásica de MAPKKK > MAPKK > MAPK de TLR4. Cuando vuelve a ser expuesta a LPS (Figura 10), la MFI de P-ERK no cambia de manera significativa por encima del tiempo 0 de control para periodos de hasta 90 minutos después de la re-estimulación con LPS.

55 P-p38: Aproximadamente un 10-15% de los monocitos (CD14+) expresan P-p38 en muestras de sangre entera no estimulada de donantes normales (Figura 11, superior izquierda). Después de la estimulación con LPS primaria, el total de la población de monocitos (~100%) muestra un aumento significativo en la MFI, alcanzando la respuesta un

5 valor máximo de MFI a los 15 minutos después de la estimulación con LPS. Los niveles de P-p38 no regresan a los valores basales, incluso después de periodos de 120 minutos, lo que muestra la distribución bi-modal observada en la Figura 11, inferior izquierda. Aproximadamente un 50% de los monocitos mantienen la misma MFI que se observa en la respuesta primaria a los 15 minutos, mientras que el resto muestra valores de MFI de la principal población en las muestras no estimuladas, lo que da como resultado un valor acumulado de MFI entre el valor de la población positiva y el de la negativa. A continuación de la re-estimulación con LPS, el valor de MFI aumenta, alcanzando el pico a los 15-20 minutos después de la re-estimulación, regresando después a una población bi-modal como se observa 90-120 minutos después de la respuesta inicial a LPS.

10 P-S6: En individuos normales, los niveles de P-S6 en monocitos no estimulados son bajos, donde ~10% de los monocitos muestran niveles de expresión de P-S6 positivos y heterogéneos (Figura 12, superior izquierda). Los niveles del pico de P-S6 después de 15-30 minutos de la estimulación con LPS, consecuente con su activación aguas abajo secundaria a la activación de P-ERK. Al contrario que P-ERK y P-p38, los niveles de P-S6 persisten durante >120 minutos a continuación de la estimulación con LPS (Figura 12, inferior izquierda). A continuación de la re-estimulación con LPS, se producen pocos cambios en la MFI de la población de P-S6, con una reducción gradual en la MFI, tal como se muestra en la Figura 12, inferior derecha.

15 P-SAPK: Los niveles de P-SAPK aumenta después de la estimulación inicial con LPS, llegando a su pico después de 15 minutos. De forma similar que los niveles de P-p38, los niveles de P-SAPK no regresan a los niveles basales hasta 120 minutos después de la estimulación, muestran 30-40% de monocitos positivos de P-SAPK, con una MFI acumulada que refleja los valores combinados del porcentaje y la intensidad de fluorescencia de las poblaciones positivas y negativas.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el estado de activación de una proteína de señalización de una vía de transducción de señales en una muestra que contiene leucocitos que comprende:

- 5 a) activar las proteínas activables de al menos una vía de transducción de señales en los leucocitos de la muestra exponiendo la muestra que contiene leucocitos a un activador de pan-quinasa;
- b) conservar la muestra activada con un conservante;
- c) desenmascarar epítomos intracelulares de los leucocitos conservados en la muestra;
- 10 d) poner en contacto los epítomos intracelulares desenmascarados de los leucocitos conservados con una pluralidad de moléculas de captura marcadas con fluorescencia, donde dicha pluralidad de moléculas de captura comprende al menos dos moléculas de captura diferentes capaces de unirse al estado activado de al menos dos diferentes epítomos intracelulares desenmascarados de los leucocitos conservados y activados en la muestra, y al menos una molécula de captura de control, en donde la molécula de captura de control se une a un epítomo en los leucocitos conservados que es no es activado por el activador de pan-quinasa,
- 15 e) detectar la intensidad de fluorescencia media de la población conservada y activada de leucocitos capturados por la unión de las moléculas de captura al estado activado de los epítomos intracelulares desenmascarados;
- f) detectar la intensidad de fluorescencia media de la población de los leucocitos conservados capturados por la unión de la molécula de captura de control; y
- 20 g) comparar la intensidad de la población de los leucocitos conservados y activados detectados, capturados por las moléculas de captura, con la intensidad de fluorescencia media de la población de los leucocitos detectados conservados, capturados por la molécula de captura de control.

2. Método según la reivindicación 1, que además comprende:

- 25 h) evaluar la intensidad de fluorescencia media comparada de la población medida en la etapa g) con respecto a la intensidad de fluorescencia media comparada de la población medida en una muestra de referencia no activada.

3. Método según la reivindicación 2, en donde la muestra es de un paciente y la evaluación de la intensidad de fluorescencia media de la población indica que el paciente tiene una enfermedad o condición asociada a la transducción de señales cuando la intensidad de fluorescencia media de la población de las muestras activadas y no activadas son aproximadamente comparables.

30

4. Método según la reivindicación 3, en donde la enfermedad o condición asociada a la transducción de señales es inflamación, trastorno autoinmune, alergia, fiebre, sepsis, cáncer, diabetes, o fallo cardiaco.

5. Método según la reivindicación 4, que además comprende la repetición de las etapas a) a la g) con una muestra del paciente después de que el paciente haya recibido un agente terapéutico para tratar la inflamación, fiebre, sepsis, cáncer, diabetes, o fallo cardiaco y monitorizar la efectividad de dicho agente terapéutico monitorizando un cambio en la intensidad de fluorescencia media de la población entre las muestras activadas y no activadas.

35

6. Método según la reivindicación 4, en donde la muestra procede de un paciente que recibe un inhibidor de quinasa.

7. Método según la reivindicación 2, en donde la muestra ha sido expuesta a un inhibidor putativo de quinasa y donde el método además comprende la determinación de la efectividad del inhibidor de quinasa cuando la muestra activada no demuestra un cambio en la intensidad de fluorescencia media de la población de las proteínas activables de al menos una vía de señal de transducción.

40

8. Método según la reivindicación 7, en donde el inhibidor putativo de quinasa es un inhibidor putativo de ERK o PI3K, que además comprende la monitorización de la inhibición de la S6 ribosómica, en donde la inhibición tanto de ERK como de PI3K se requiere para la inhibición de la S6 ribosómica mediante:

- 45 i) exposición de la muestra a un inhibidor de ERK conocido y a un inhibidor putativo de PI3K y monitorización de la inhibición de la S6 ribosómica; o

ii) exposición de la muestra a un inhibidor de PI3K conocido y a un inhibidor putativo de ERK y monitorización de la inhibición de la S6 ribosómica.

9. Método según la reivindicación 1, que comprende la medición de la actividad de al menos una segunda vía de transducción de señales.

5 10. Método según la reivindicación 1, en donde dicha detección se logra por citometría.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha proteína de la vía de transducción de señales se selecciona del grupo que consiste en PI3K, proteína S6 ribosómica, p44/42 MAP quinasa, TYK2, p38 MAP quinasa, PKC, PKA, SAPK, ELK, JNK, cJun, RAS, Raf, MEK 1/2, MEK 3/6, MEK 4/7, ZAP-70, LAT, SRC, LCK, ERK 1/2, Rsk 1, PYK2, SYK, PDK1, GSK3, FKHR, AFX, PLCg, PLCy, FAK, CREB, α III β 3, Fc ϵ RI, BAD, p70S6K, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5, STAT6, o combinaciones de las mismas.

10 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho activador de pan-quinasa es un activador del receptor tipo Toll 4 (TLR4) o lipopolisacárido (LPS).

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la molécula de captura es un anticuerpo o antígeno que se une a un fragmento de la misma.

15 14. Método según la reivindicación 13, en donde dicho anticuerpo es específico para un estado de fosforilación de dicha proteína de la vía de transducción de señales, en donde dicho anticuerpo específico al estado de fosforilación se selecciona de forma opcional del grupo que consiste en anti-fosfo-p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-TYK2 (Tyr1054/1055), anti-fosfo-p38 MAP quinasa (Thr180/Tyr182), anticuerpo de sustrato fosfo-PKC-PAN, anticuerpo de sustrato fosfo-PKA-, anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), anti-fosfo-tirosina (P-tyr-100), anti-p44/42 MAPK, anti-fosfo-MEK1/2 (Ser217/221), anti-fosfo-p90RSK (Ser381), anti-p38 MAPK, anti-JNK/SAPK, antifosfo-Raf1 (Ser259), anti-fosfoElk-1 (Ser383), anti-fosfo-CREB (Ser133), antifosfoSEK1/MKK4 (Thr261), anti-fosfo-Jun (Ser 63), anti-fosfoMKK3/MKK6 (Ser189/207), anti-AKT, anti-fosfo FKHR, anti-FKHR, antifosfo-Gsk3 alp21, anti-pAFX, anti-PARP, anti-BAD, anti-BADser 112, anti-BADser 136, anti-fosfo-BADser 155, anti-p27, anti-p21, anti-cFLIP, antiMYC, anti-p53, anti-NFKB, anti-Ikk α , anti-Ikk β , anti-fosfo-tirosina, y anti-fosfo-treonina.

25

Figura 1 - Estimulación de MAPK y NF-κB con LPS

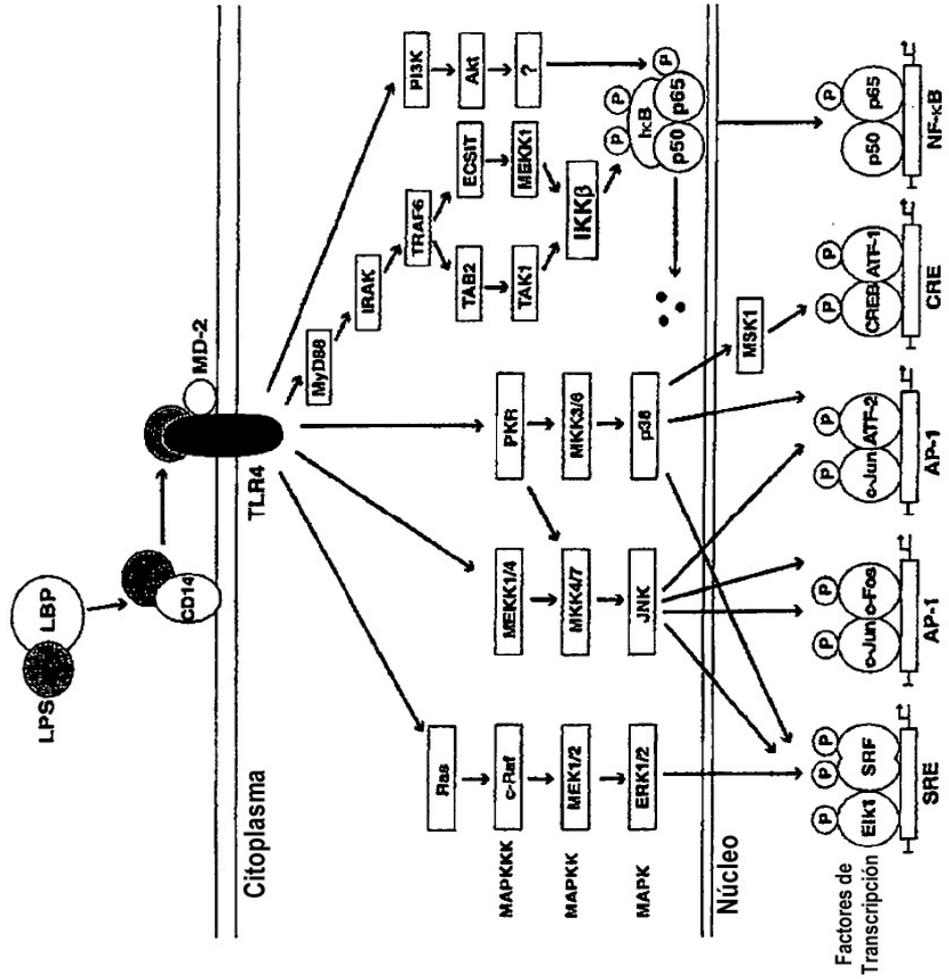


Figura 2 - Control de sangre entera no estimulada

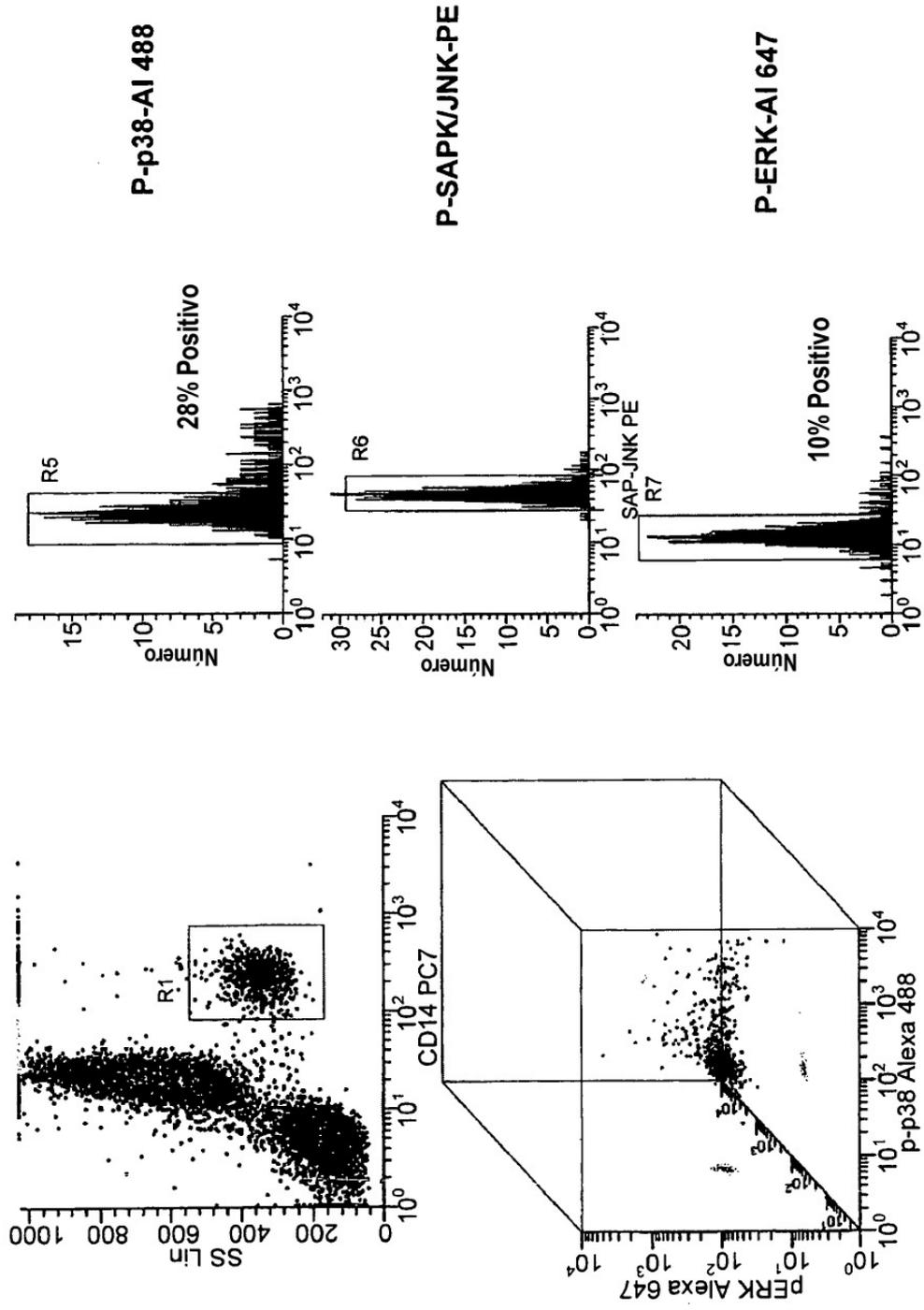
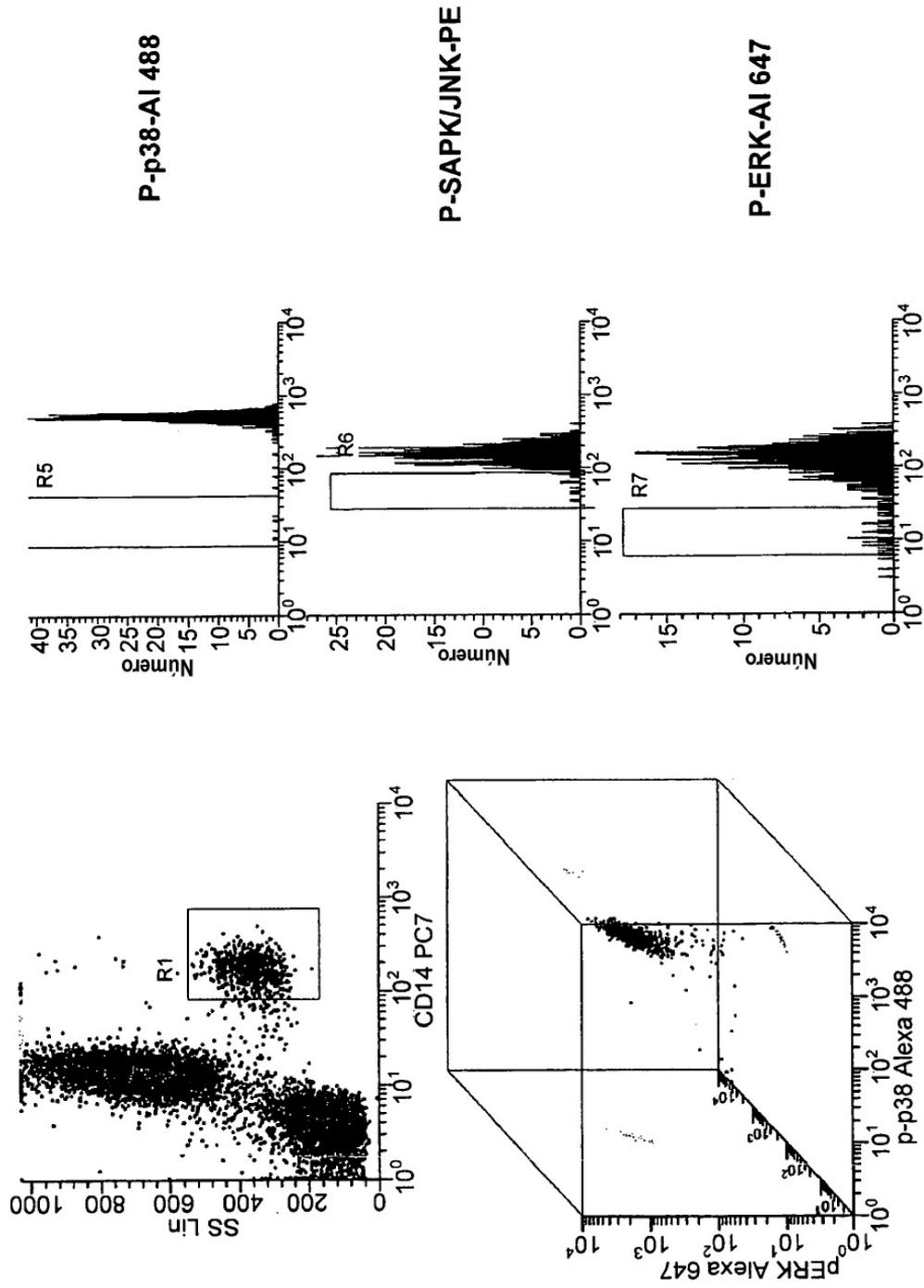


Figura 3 - Sangre entera incubada con LPS



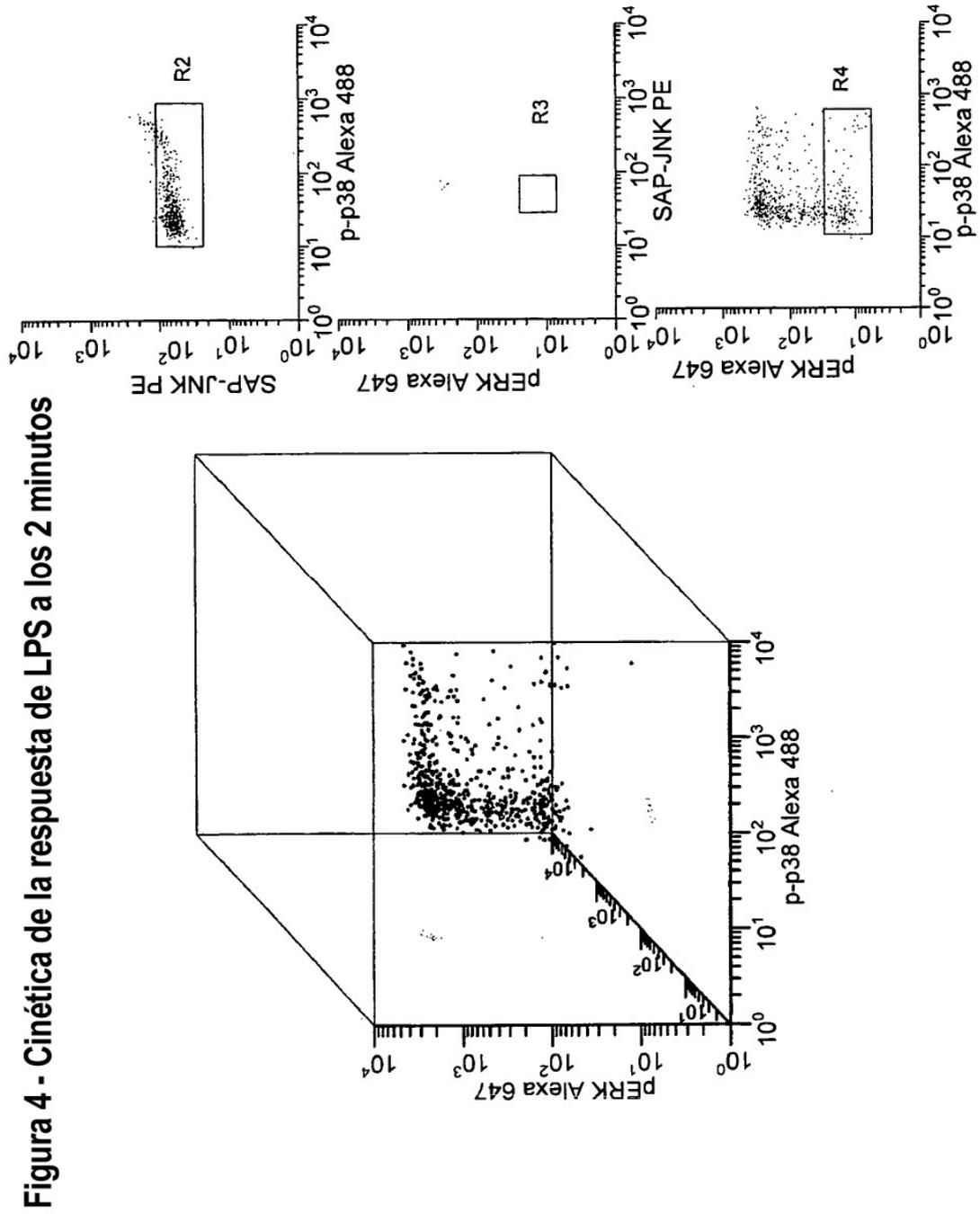


Figura 4 - Cinética de la respuesta de LPS a los 2 minutos

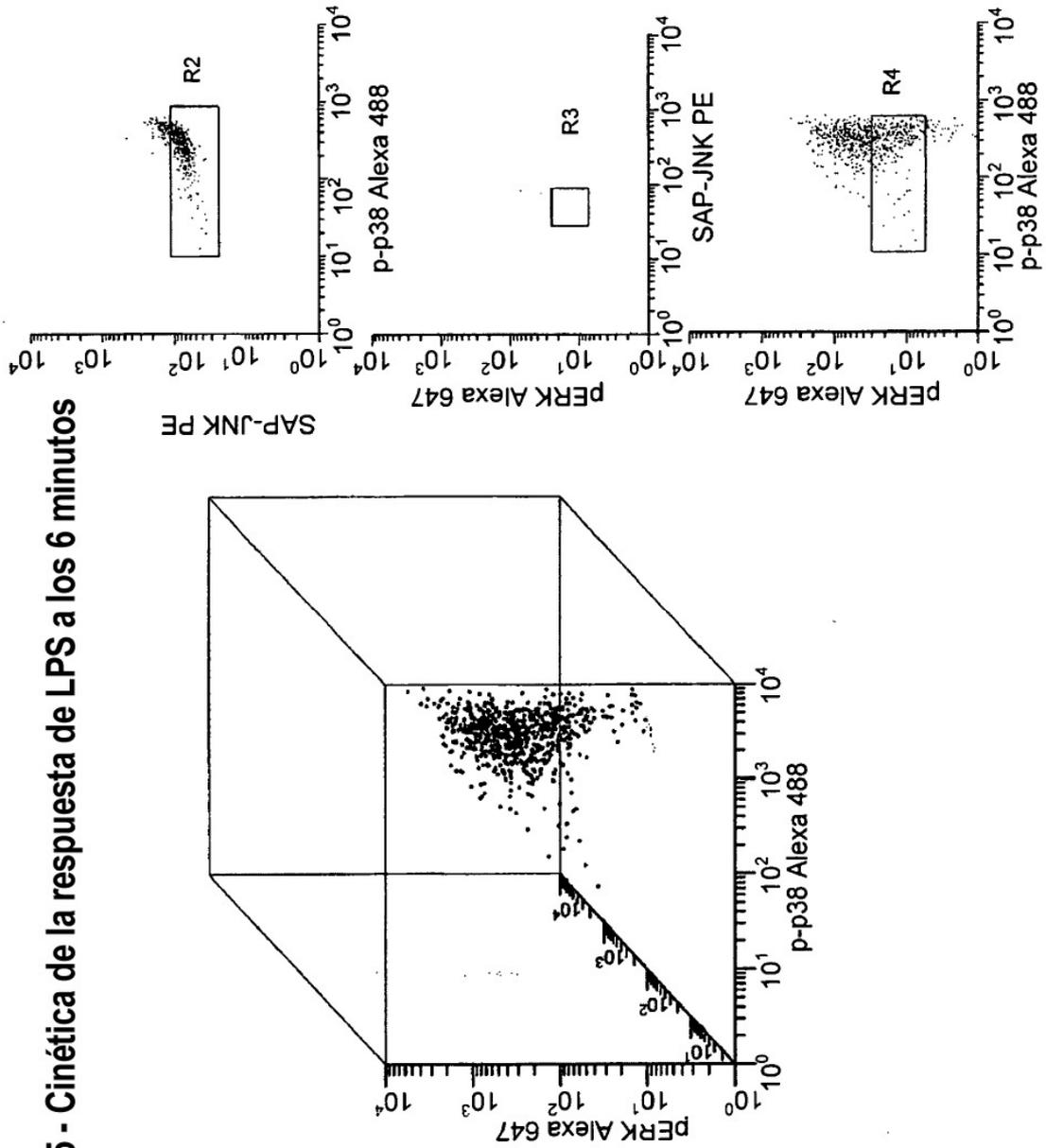


Figura 5 - Cinética de la respuesta de LPS a los 6 minutos

Figura 6 - Cinética de la respuesta de LPS a los 60 minutos

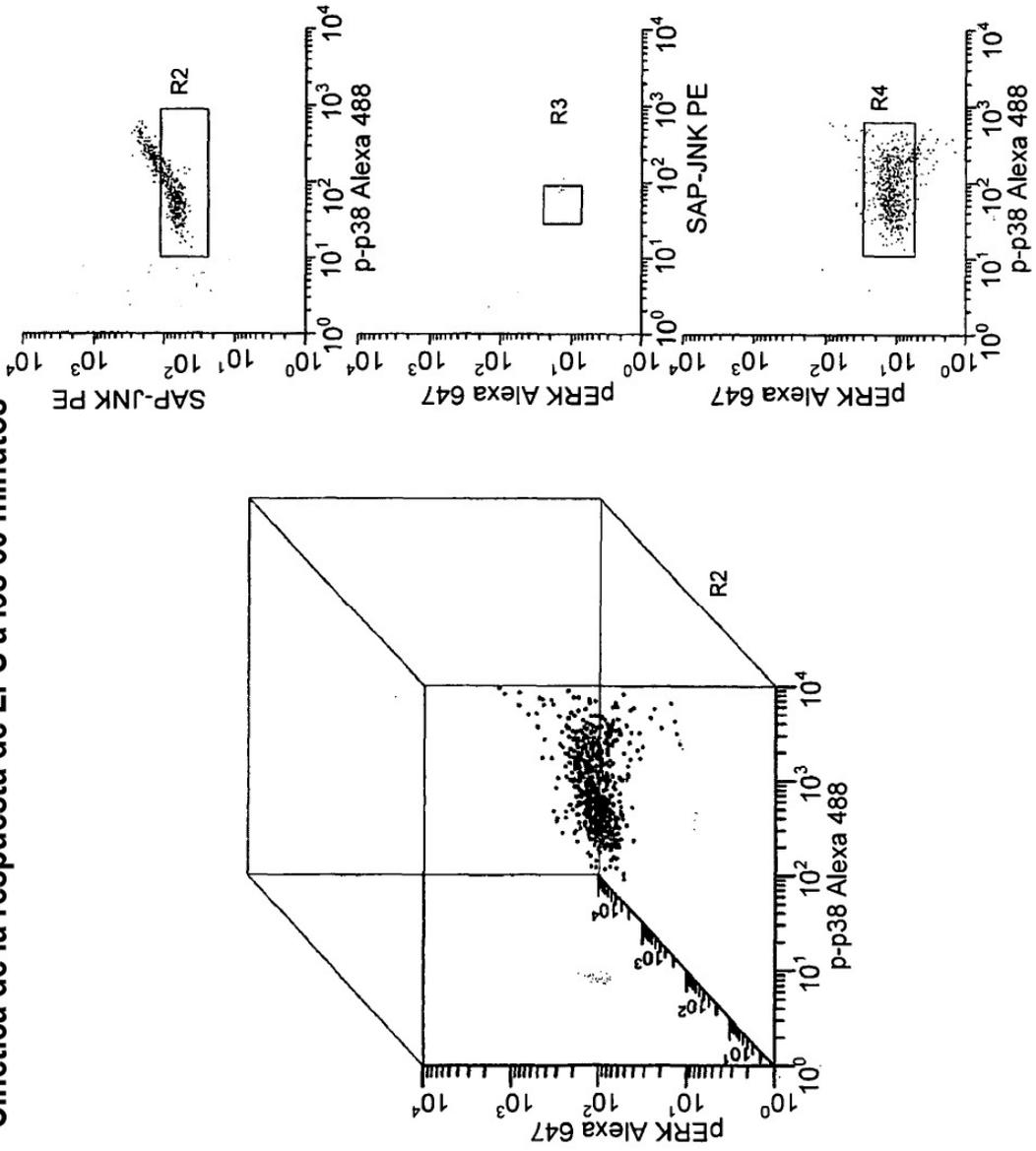


Figura 7 - Respuesta de la S6 ribosómica a la estimulación con LPS

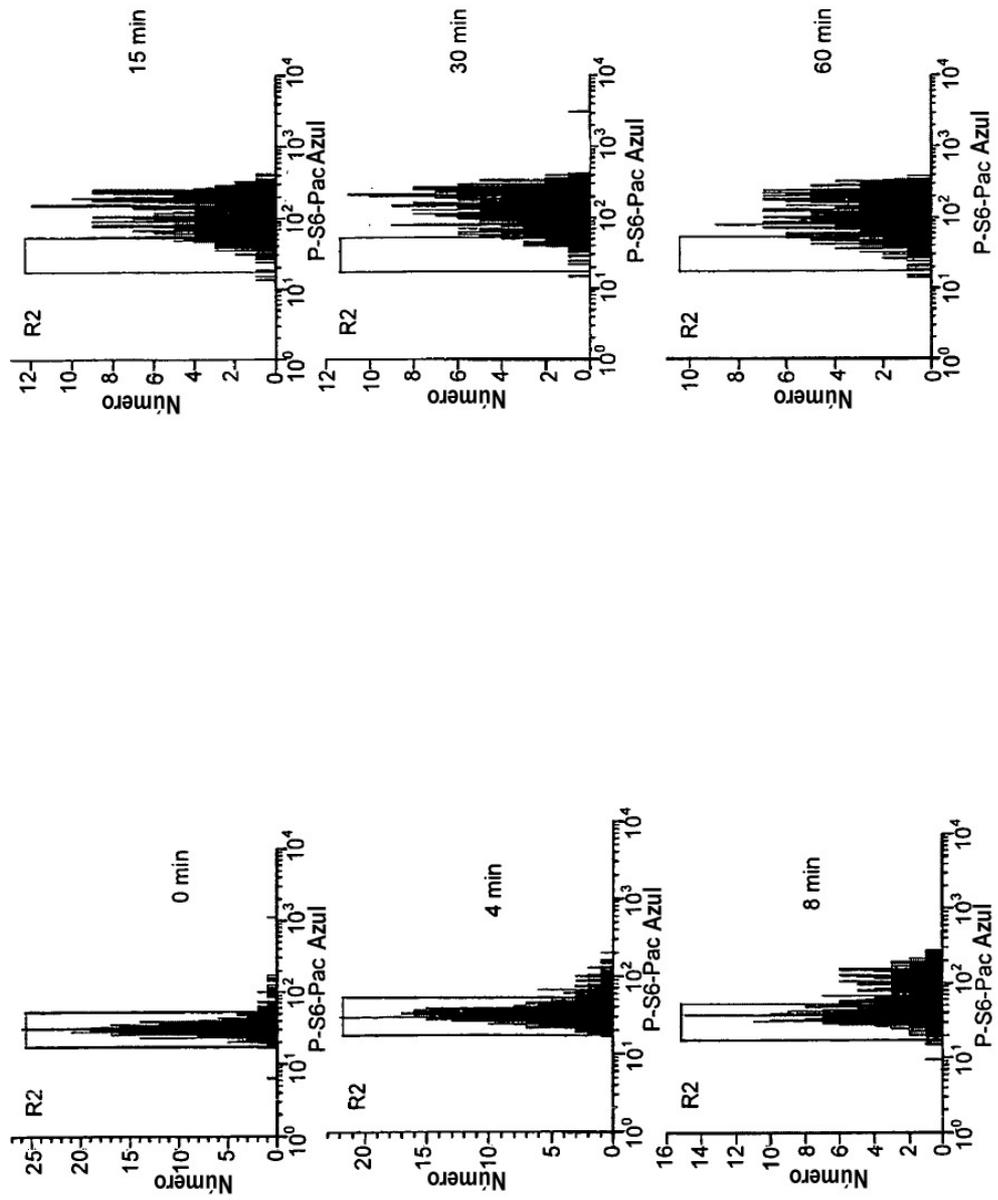
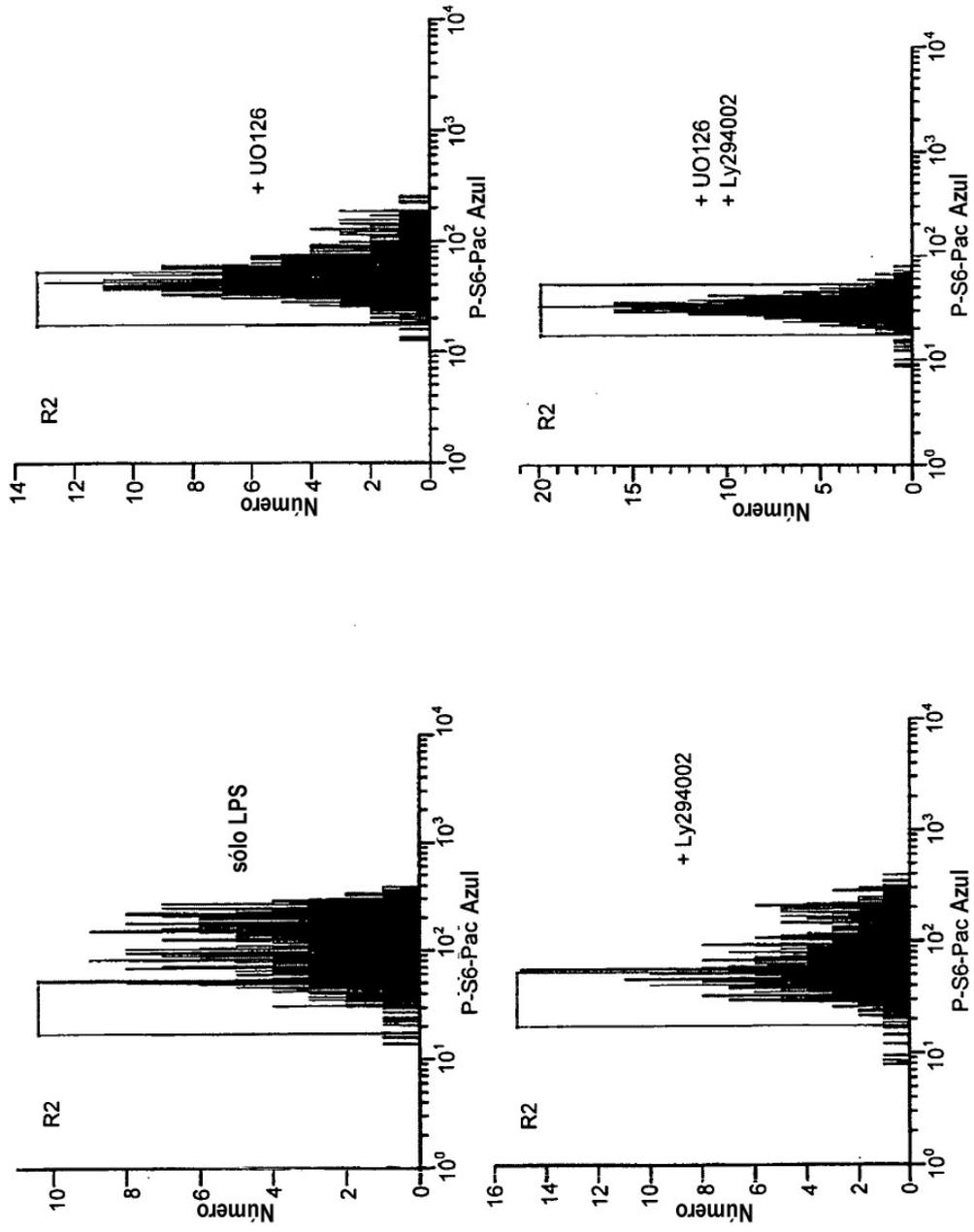


Figura 8 - Inhibición de la S6 ribosómica mediante inhibidores de ERK y PI3K



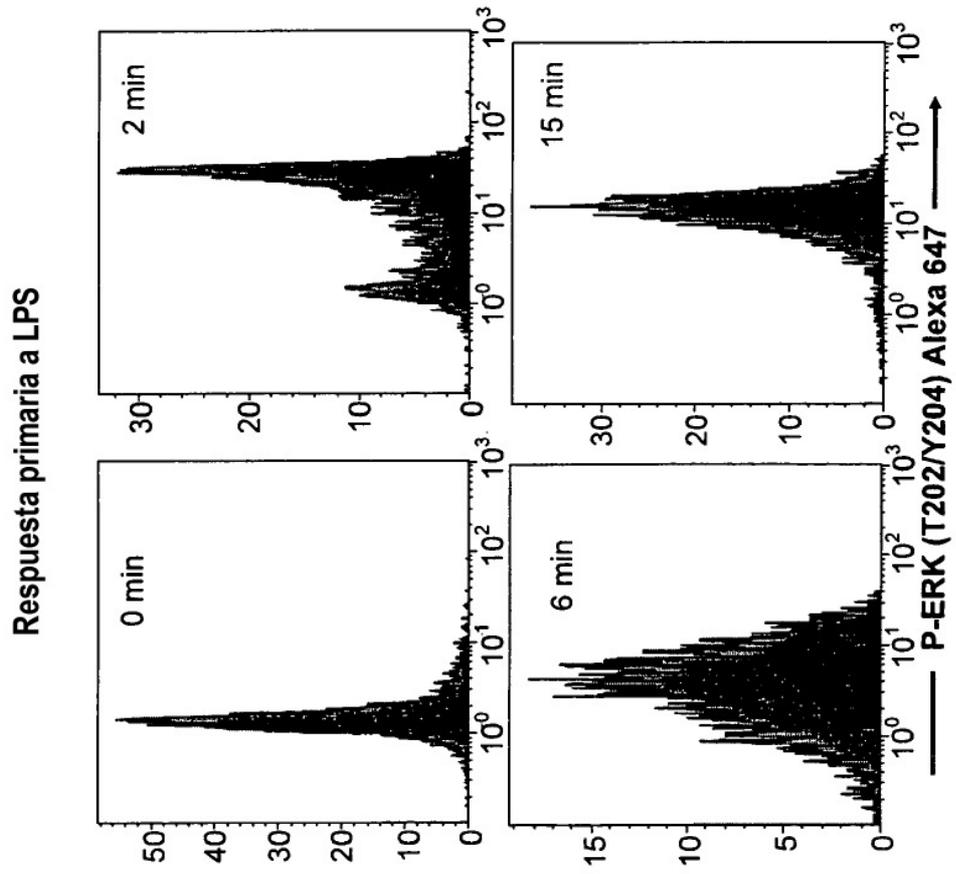


FIG. 9

Re-estimulación con LPS (Tiempo después de la segunda adición de LPS)

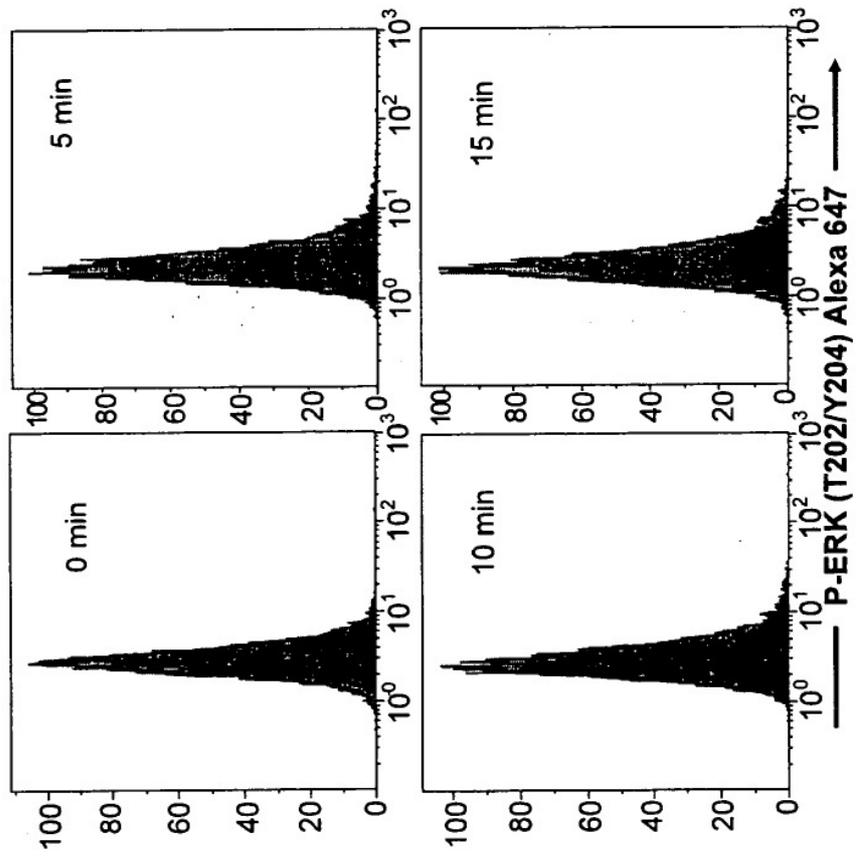


FIG. 10

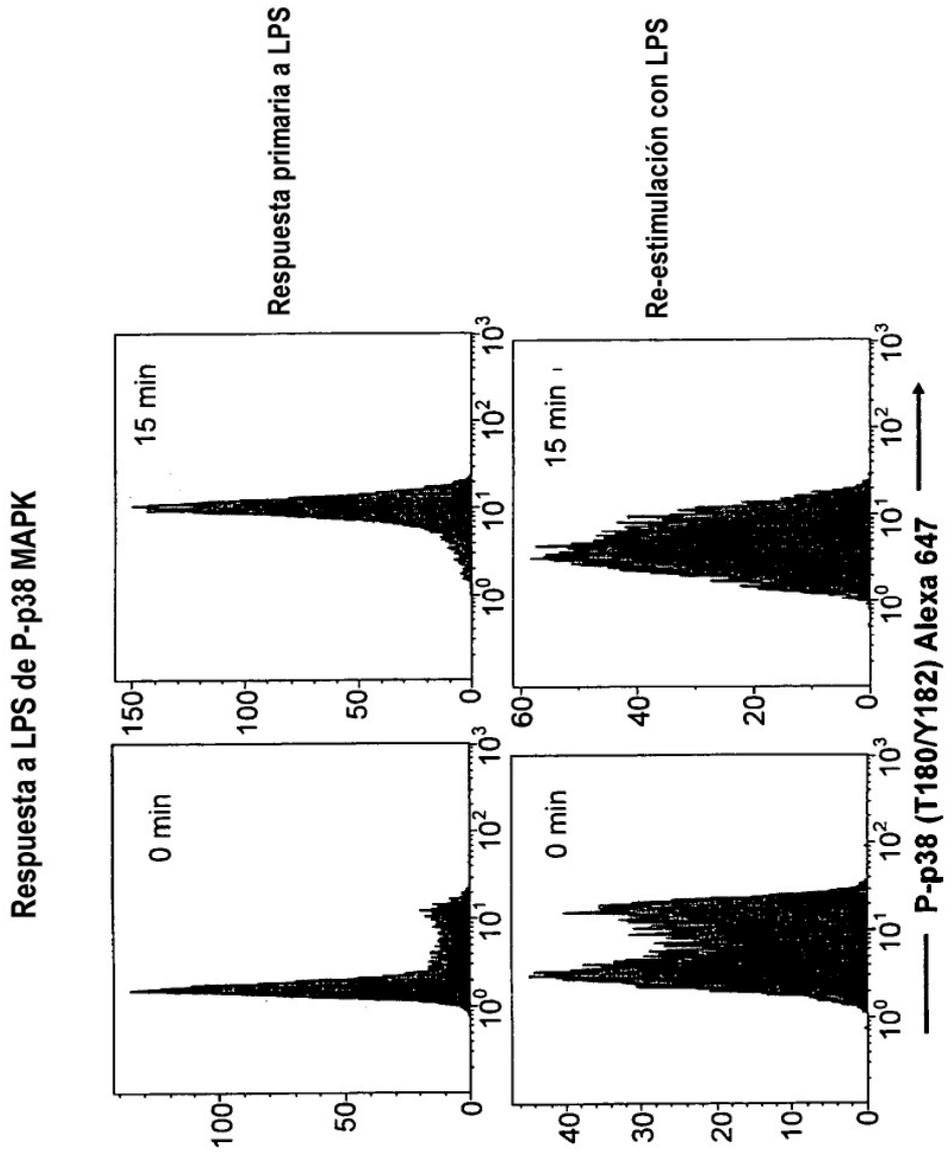


FIG. 11

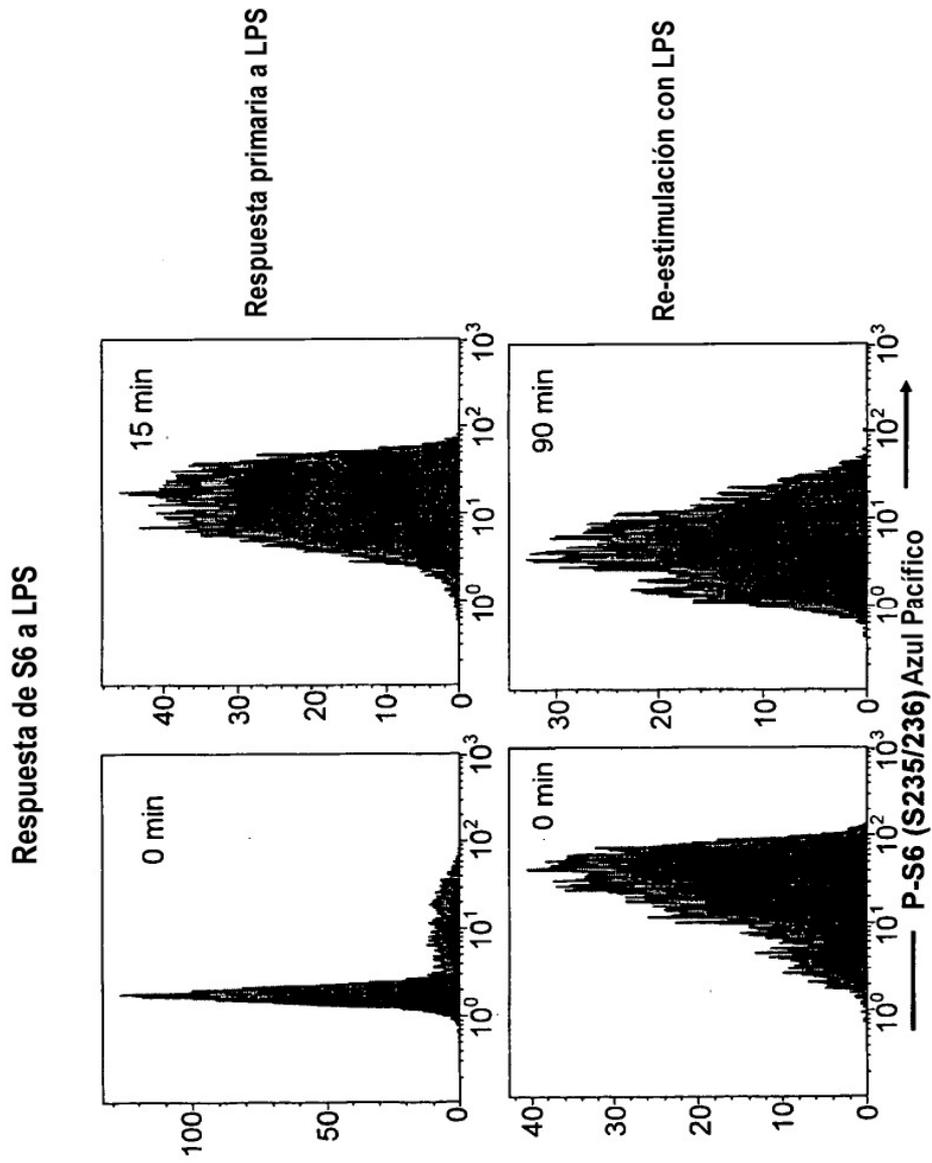


FIG. 12