

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 424**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009 E 09791584 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2013 EP 2318548**

54 Título: **Métodos y sistemas para predecir respuesta de células frente a un agente terapéutico**

30 Prioridad:

17.04.2009 US 170367 P

15.08.2008 US 189053 P

20.02.2009 US 208206 P

30.09.2008 US 194702 P

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

11.12.2013

73 Titular/es:

MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)

One Kendall Square Suite B7201
Cambridge, MA 02139 , US

72 Inventor/es:

SCHOEBERL, BIRGIT;
HARMS, BRIAN;
GIBBONS, FRANCIS, DAVID;
FITZGERALD, JONATHAN, BASIL;
ONSUM, MATTHEW, DAVID;
NIELSEN, ULRIK y
KUBASEK, WILLIAM

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 433 424 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

Métodos y sistemas para predecir respuesta de células frente a un agente terapéutico

5 Antecedentes de la invención

Se han realizado avances considerables en el desarrollo de terapias dirigidas para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades. Tales terapias dirigidas incluyen anticuerpos monoclonales que se unen a antígenos que se expresan específicamente o de forma preferente en células tumorales y fármacos de molécula pequeña que interfieren específicamente con componentes específicos de rutas de señalización activas en células tumorales. Por ejemplo, cetuximab (Erbbitux[®]) es un anticuerpo monoclonal que se dirige al receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR, también conocido como ErbB1 o HER1) que se expresa en al menos determinados cánceres de colon y cánceres de cabeza y cuello. También, por ejemplo, imatinib (Gleevec[®]) es una molécula pequeña que se dirige a la tirosina quinasa BCR-Abl, que se expresa y actúa como un factor oncogénico, en determinadas leucemias mieloides crónicas y es una variante anormal de una proteína celular benigna. Aunque tales terapias dirigidas han demostrado ser eficaces en algunos pacientes, el índice de respuesta nunca es del 100%. Por ejemplo, el índice de respuesta promedio para monoterapia de cetuximab es únicamente aproximadamente el 15-20% de pacientes, incluso cuando se sabe que los tumores expresan ErbB1 (EGFR). Por tanto, la expresión simple de ErbB1 (el antígeno al que se dirige el anticuerpo cetuximab) en un tumor no garantiza la sensibilidad a cetuximab.

Por lo tanto, aunque las terapias dirigidas son muy prometedoras, el índice de respuesta variable de los pacientes a tales terapias, combinado con los efectos secundarios asociados con tales terapias y el coste típico elevado de tales terapias, indica que los métodos para tratar pacientes que implican la predicción de cuáles pacientes son propensos a responder al tratamiento terapéutico y la administración del tratamiento únicamente a los pacientes que se predice que responderán son altamente deseables. Un enfoque que se ha tomado ha sido tratar de identificar marcadores genéticos (por ejemplo, mutaciones o alelos) que se correlacionan con la sensibilidad a la terapia. En este enfoque, se determina el genotipo de una muestra de un paciente antes del tratamiento para determinar si el paciente porta un marcador o marcadores genéticos que son indicativos de sensibilidad a terapia. Otro enfoque que se ha adoptado es tratar de identificar biomarcadores de proteína que se correlacionan con sensibilidad a terapia. En este enfoque, la expresión de proteína se determina en una muestra a partir del paciente antes del tratamiento para determinar si el paciente expresa uno más biomarcadores de proteína que son indicativos de sensibilidad a terapia.

Ambos enfoques mencionados anteriormente se pueden considerar enfoques de marcador "directo", donde la presencia (o ausencia o nivel de expresión) del marcador o marcadores (por ejemplo, BCR-Abl o ErbB1) que se está midiendo directamente se ha demostrado que se correlaciona con la sensibilidad o la no sensibilidad a la terapia. Además, ambos de estos enfoques dependen del uso de marcadores que son suficientemente estables en células de forma que los mismos se pueden medir o cuantificar de forma fiable en una muestra que se ha aislado a partir del paciente. Considerando que puede haber un lapso de tiempo considerable entre el momento en el que una muestra se aísla a partir de un paciente y el momento en el que el marcador o marcadores se miden en la muestra, tales enfoques de marcador "directo" descritos anteriormente típicamente requieren el uso de marcadores genéticos o de proteína que no estén sujetos a degradación o alteración a lo largo del tiempo cuando las muestras se someten a procesamiento y manipulación convencional. Aunque se han identificado tales marcadores "directos" estables que son predictivos de sensibilidad a determinados agentes terapéuticos, no está claro si tales marcadores se pueden identificar para todos los agentes terapéuticos.

Se cree que los tumores se impulsan a crecer por una serie de rutas de señalización activadas por ligando, que habitualmente se activan por ligandos que se unen a sus receptores afines, induciendo la fosforilación del propio receptor así como también de quinasas cadena abajo, conduciendo a fosforilación adicional de componentes cadena abajo de la ruta. Estas quinasas desencadenan la supervivencia y proliferación celular. Por consiguiente, la activación de la ruta de señalización conduce a alteración de componentes intracelulares, en particular fosforilación de proteína. La firma de fosforilación de los receptores expresados en tejido tumoral puede ayudar a identificar las rutas principales que impulsan la progresión de un tumor particular. Sin embargo, las fosfoproteínas pueden ser muy lábiles y la fosforilación puede disiparse rápidamente después de cirugía si la muestra de tejido no se congela inmediatamente y rápidamente (o, en algunos casos, si no se fija en formalina). Además, incluso cuando es posible medir de forma fiable los niveles de una o más fosfoproteínas en una muestra de un tumor particular, el valor predictivo de la presencia o ausencia de cualquier fosfoproteína particular con respecto a la eficacia del tratamiento de un tumor de este tipo con cualquier agente terapéutico particular generalmente se desconoce. Por lo tanto, aunque los perfiles de fosfoproteína contienen información importante acerca de las rutas que impulsan la progresión tumoral, tales perfiles de fosfoproteína actualmente no se usan ampliamente como biomarcadores para predecir la sensibilidad a tratamiento terapéutico.

Por consiguiente, se necesitan métodos nuevos para determinar los niveles de diversas fosfoproteínas y de uso de tales niveles y otras características de células tumorales para predecir la sensibilidad de tumores individuales frente a agentes terapéuticos particulares para mejorar la eficacia terapéutica y de coste de terapias contra el cáncer.

Sumario de la invención

En el presente documento se proporcionan métodos para predecir la sensibilidad de células, en particular células neoplásicas tales como células tumorales (por ejemplo, células de tumores benignos o células de tumores malignos) y células malignas que no son células tumorales, frente a agentes terapéuticos y métodos para tratar pacientes que tienen tales tumores con agentes terapéuticos.

La invención proporciona un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método para tratar un paciente que tiene un tumor neoplásico, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo anti-ErbB3 al paciente si el nivel de ErbB3 fosforilado (pErbB3) en una muestra del tumor obtenida a partir del paciente se determina que no es menor de 0,064 pg/μg de proteína total.

En determinadas realizaciones, el tumor es un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tumor es un tumor maligno de un órgano seleccionado entre colon, pulmón, recto, vesícula biliar, cerebro, médula espinal, mama, riñón, páncreas, estómago, hígado, hueso, piel, bazo, ovario, testículo, próstata y músculo.

El anticuerpo anti-ErbB3 puede comprender al menos uno de:

- (i) un anticuerpo que tiene las secuencias de región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L) como se muestra en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 7-9 y 10-12, respectivamente;
- (ii) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 13-15 y 16-18, respectivamente;
- (iii) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 5 y 6, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 19-21 y 22-24, respectivamente;
- (iv) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 25 y 26, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 27-29 y 30-32, respectivamente; y
- (v) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 33 y 34, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 35-37 y 38-40, respectivamente,

Preferentemente el anticuerpo anti-ErbB3 comprende un anticuerpo que tiene las secuencias de región variable de cadena pesada (V_H) y de región variable de cadena ligera (V_L) mostradas en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 7-9 y 10-12, respectivamente.

En determinadas realizaciones, el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,08 pg/μg, 0,096 pg/μg, 0,122 pg/μg, 0,128 pg/μg, 0,144 pg/μg o 0,16 pg/μg de proteína total.

En determinadas realizaciones, el nivel de ErbB3 en las células de muestra se determina inferencialmente midiendo los niveles de otros biomarcadores más estables y usando un método computarizado usando un sistema informático para generar un modelo informático para calcular (en base a niveles reales medidos empíricamente de otros biomarcadores en las células de la muestra) un Estado de Activación de Red que determine, mediante simulación, los niveles de pErbB3 en las células de la muestra.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1D son gráficos que muestran la inhibición del crecimiento de tumor de xenoinjerto mediante tratamiento con el anticuerpo Ab N° 6.

La Figura 1A muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de MALME3M. La Figura 1B muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de DU145. La Figura 1C muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de ADRr. La Figura 1D muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de ACHN.

La Figura 2 es un gráfico que representa la concentración de ErbB3 fosforilado (pErbB3) en tumores de xenoinjerto no tratados (en pg/μg de proteína total) frente a la Reducción del Índice de Crecimiento (%) observada para los xenoinjertos cuando se tratan con Ab N° 6.

Las Figuras 3A-3E son gráficos de barras que muestran el nivel de pErbB3 (Figura 3A) y AKT fosforilado (pAKT) (Figura 3B) en muestras de tumor de xenoinjerto de ACHN congeladas 0, 10, 30 o 60 minutos después de la disección del xenoinjerto y los niveles de ErbB1 (Figura 3C), ErbB2 (Figura 3D) y ErbB3 (Figura 3E) en muestras de tumor de xenoinjerto de EKVX congeladas 0, 10, 30 o 60 minutos después de disección de xenoinjerto.

Las Figuras 4A-4D muestran un diagrama esquemático del proceso de conversión de un dibujo de una ruta de señalización en un modelo informático. La Figura 4A muestra un dibujo de la ruta de señalización de ErbB que comprende ligandos y receptores ErbB diferentes. La Figura 4B muestra un conjunto de reacciones bioquímicas

que describen las interacciones de proteínas representadas en el dibujo. La Figura 4C muestra un conjunto de flujos obtenidos a partir del conjunto de reacciones bioquímicas. La Figura 4D muestra un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales (EDO) en base a cinética de acción de masa que describen redes de traducción de señal.

Las Figuras 5A-5B son gráficos que muestran los niveles de fosfo-ErbB3, fosfo-ErbB2, fosfo-ErbB1 y fosfo-AKT a lo largo del tiempo en células estimuladas con nueve concentraciones diferentes de heregulina (HRG) (Figura 5A) o betacelulina (Figura 5B) en células de cáncer ovárico ADRr. Los parámetros del modelo computacional se calibraron para los resultados de simulación (líneas continuas) para describir los datos experimentales (puntos).

La Figura 6 es un gráfico de barras que muestra el resultado del análisis de sensibilidad local para identificar marcadores clave de activación de ErbB3.

La Figura 7 es un gráfico que muestra los niveles calculados de pErbB3 en las líneas de células MALME3M, DU145, ADRr y ACHN.

Las Figuras 8A-8B son gráficos que muestran el uso de valores de NAS para predecir la sensibilidad de 15 líneas celulares frente a tratamiento con Ab N° 6, en base a valores de NAS de umbral establecidos a partir de las 4 líneas de células en entrenamiento (MALME3M, DU145, ADRr y ACHN).

La Figura 8A es un gráfico de barras que representa niveles de pErbB3 simulados para las 19 líneas celulares, desde los niveles más altos hasta los niveles más bajos de pErbB3.

La Figura 8B es un gráfico que clasifica las 19 líneas celulares desde el valor de NAS más alto hasta el más bajo, clasificándose las líneas celulares que tienen los valores de NAS por debajo de MALME3M como no respondedoras (NR), clasificándose las líneas celulares que tienen valores de NAS por encima de ADRr como respondedoras y las líneas celulares que tienen valores de NAS entre MALME3M y ADRr clasificándose como indeterminadas.

Las Figuras 9A-9C son gráficos que muestran la inhibición de crecimiento de tumor de xenoinjerto mediante tratamiento con el anticuerpo Ab N° 6.

La Figura 9A muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de IGROV1. La Figura 9B muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de OVCAR8. La Figura 9C muestra los resultados del modelo de tumor de xenoinjerto de SKOV3.

Las Figuras 10A-10D son gráficos en los cuales se representa el logaritmo de la concentración de un receptor ErbB frente al logaritmo de la concentración de uno o más de los otros receptores ErbB. Los valores de receptor se muestran para las líneas celulares clasificadas como respondedoras o no respondedoras a Ab N° 6. La Figura 10A representa ErbB2 frente a ErbB1. La Figura 10B representa ErbB3 frente a ErbB1. La Figura 10C representa ErbB2 frente a ErbB3. La Figura 10D representa ErbB1 frente a ErbB2 frente a ErbB3.

La Figura 11 muestra un gráfico en el cual la concentración de logaritmo de HRG se representa frente a la concentración de logaritmo de ErbB1. En el gráfico, se separan las líneas celulares respondedoras frente a no respondedoras ensayadas en los estudios de xenoinjerto.

Las Figuras 12A-12C son gráficos en los cuales se representa el logaritmo de los niveles de expresión normalizados (en pg/μg, determinados por ELISA) de diferentes componentes de la ruta de señalización de ErbB en líneas de células de xenoinjerto y muestras de tumor humano.

La Figura 12A representa ErbB2 frente a ErbB1. La Figura 12B representa ErbB4 frente a ErbB3. La Figura 12C representa HRG-β1 frente a BTC. Las Figuras 13A-13D son gráficos que muestran los resultados de inmunohistoquímica cuantitativa (qIHC) para líneas de células de xenoinjerto y muestras de tumor humano. La Figura 13A muestra una curva normal de la línea celular para ErbB1. Las Figuras 13B, 13C y 13D son gráficos de barras que representan los valores de qIHC de ErbB1, ErbB2 y ErbB3, respectivamente, en las líneas celulares de xenoinjerto (barras rojas) y muestras de tumor humano (barras azules).

La Figura 14 es un gráfico de barras que muestra el nivel de heterodímero ErbB 1:3 fosforilado integrado (cantidad de heterodímeros integrados en el tiempo por célula) calculado para ocho líneas celulares, lo que les separa en no respondedoras (MALME3M, BT474, IGROV1 y ADRr) y respondedoras (OVCAR8, SKOV3, DU145 y ACHN) frente a Ab N° 6.

Las Figuras 15A y 15B son diagramas de flujo que incluyen diversas etapas funcionales y actos que se pueden llevar a cabo durante la implementación de determinadas realizaciones de la invención.

La Figura 16 es una realización de un entorno informático que se puede usar para implementar determinados aspectos de la invención.

Las Figuras 17A-D son gráficos de curvas de inhibición para células tratadas con el anticuerpo biespecífico H3 x B1D2. Las Figuras 17A y 17B muestran las curvas de inhibición para niveles de pErbB3 y niveles de pAKT, respectivamente, en células OVCAR8. Las Figuras 17C y 17D muestran las curvas de inhibición para los niveles de pErbB3 y niveles de pAKT, respectivamente, en células OVCAR8 transfectadas con HER2/ErbB2 (células OVCAR8-HER2). La línea continua representa los datos simulados a partir del modelo computacional, mientras que los círculos representan los datos determinados experimentalmente. Los valores de CI_{50} simulados (DR50sim) y los valores de CI_{50} determinados experimentalmente (DR50datos) también se muestran.

Las Figuras 18A-D son gráficos de curvas de inhibición de células tratadas con el anticuerpo biespecífico H3 x B1D2. Las Figuras 18A y 18B muestran las curvas de inhibición para los niveles de pErbB3 y niveles de pAKT, respectivamente, en células ADRr. La línea continua representa los datos simulados a partir del modelo computacional, mientras que los círculos representan los datos determinados experimentalmente. Los valores de CI_{50} simulados (DR50sim) y los valores de CI_{50} determinados experimentalmente (DR50datos) también se muestran. Las Figuras 18C y 18D muestran las curvas de inhibición simulada para los niveles de pErbB3 y los niveles de pAKT, respectivamente, en células ADRr con tratamiento simulado con ARNi de ErbB1.

Las Figuras 19A-C son gráficos de los índices de crecimiento relativo (ICR) determinados *in vivo* de un panel de células tumorales en un modelo de xenoinjerto tratadas con H3 x B1D2 representados frente a los niveles calculados de monómeros de ErbB2 (Figura 19A), homodímeros ErbB2:ErbB2 (Figura 19B) y heterodímeros ErbB2:ErbB3 (Figura 19C) en el panel de células tumorales en ausencia de H3 x B1D2.

Las Figuras 20A-B son gráficos de los índices de crecimiento relativo (ICR) determinados *in vivo* de un panel de células tumorales en un modelo de xenoinjerto tratadas con H3 x B1D2 representados frente a los niveles relativos calculados de heterodímeros ErbB2:ErbB3 (Figura 20A) y heterodímeros ErbB1:ErbB3 (Figura 20B) en el panel de células tumorales en ausencia y presencia simulada de H3 x B1D2.

La Figura 21 proporciona representaciones gráficas de datos predichos (líneas de trazos) y reales (puntos de datos) de señalización de pErbB3 y pAKT inducida por HRG a partir de la línea de células que sobreexpresa ErbB2 BT474-M3 a dosis de HRG como se han indicado, como se detalla en el Ejemplo 11.

Descripción detallada

En el presente documento se describen métodos, sistemas y productos de programa informático en los cuales en el estado de activación de uno o más elementos (por ejemplo, ErbB3) en una o más rutas de señalización celular se determina a través del uso de marcadores indirectos en lugar de a través de medición directa de niveles de uno o más elementos. Tales mediciones indirectas se pueden usar para determinar el estado de activación de elementos en una ruta de señalización a través de simulación informática que modela la ruta de señalización. Utilizando los métodos descritos en el presente documento, esta información se puede usar posteriormente para predecir la sensibilidad de células frente a agentes terapéuticos y, por tanto, para seleccionar un tratamiento terapéutico para un paciente que tiene una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer).

A través del uso de los métodos descritos, se puede conseguir la determinación de una firma de fosforilación ilustrativa de una muestra de células tumorales. Esto permite el uso de proteínas celulares fosforiladas como biomarcadores de sensibilidad frente a agentes terapéuticos sin la necesidad de medir directamente los niveles de tales fosfoproteínas en muestras de paciente, evitando de este modo los problemas potenciales asociados con la medición de fosfoproteína (por ejemplo, inestabilidad, no fiabilidad). Tales firmas de fosforilación determinadas por simulación se pueden usar para predecir de forma precisa la sensibilidad de las células frente a agentes terapéuticos antineoplásicos y, por lo tanto, se pueden usar para evitar administrar fármacos de cáncer al paciente que son ineficaces para tratar el cáncer del paciente. Además, los métodos desvelados permiten la simulación de los niveles de otros componentes lábiles dentro de una red celular, tales como homo y/o heterodímeros de receptores u homo y/o heterodímeros fosforilados, dentro de redes celulares, componentes que también se pueden usar para predecir la sensibilidad de células frente a agentes terapéuticos. Adicionalmente, los métodos desvelados permiten la simulación del efecto de un agente terapéutico sobre componentes dentro de una red celular, lo cual también se puede usar para predecir la sensibilidad de células frente al agente terapéutico.

En determinados métodos, se miden los niveles de uno o más componentes celulares estables (tales como receptores de superficie celular, ligandos y similares) dentro de una red celular en una muestra de células (por ejemplo, células en una biopsia de tumor o un tumor resecado). En base a estas mediciones, se calcula un Estado de Activación de Red (o NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional (por ejemplo, un modelo computacional mecanicista) de una o más redes de transducción de señal. Por ejemplo, el NAS puede ser un valor numérico que representa el nivel calculado de una proteína fosforilada (que no se ha medido directamente) dentro de la red celular. Como alternativa, el NIS puede ser un valor numérico que representa el nivel calculado de un componente dentro de la red celular en presencia simulada del agente terapéutico (en comparación con el nivel del componente en ausencia simulada del agente terapéutico). Mediante la comparación del NAS o NIS calculado con valores de control que representan los valores umbral de sensibilidad o no sensibilidad, se puede predecir si las células son propensas a responder al tratamiento terapéutico o no.

Por tanto se desvela el uso de marcadores "indirectos" de sensibilidad celular al tratamiento, donde el nivel de ese marcador "indirecto" (por ejemplo, una proteína fosforilada o dímero dentro de una ruta de señalización activada) no se mide directamente sino que se calcula o simula, en base a los niveles de otros componentes celulares que se miden directamente. Los métodos también pueden implicar el uso de algoritmos de clasificación estadística, por ejemplo en combinación con el cálculo de NAS o NIS.

En el contexto de la presente invención y como se ha descrito adicionalmente en la sección de ejemplos en el presente documento, se ha usado de forma satisfactoria un modelo computacional mecanicista de la ruta de señalización de ErbB para calcular los niveles de ErbB3 fosforilado (pErbB3), como un indicador de activación de la red celular de ErbB (o NAS) y los niveles de pErbB3 simulados demostraron predecir de forma precisa la sensibilidad de las líneas de células tumorales al tratamiento con un anticuerpo anti-ErbB3, Ab N° 6, en un sistema de xenoinjerto *in vivo*. Adicionalmente, como se describe adicionalmente en la sección de ejemplos en el presente documento, se ha usado de forma satisfactoria un modelo computacional mecanicista de la ruta de señalización de ErbB para calcular los niveles relativos de heterodímero ErbB2/ErbB3 y heterodímero ErbB1/ErbB3 en la ausencia y presencia simulada de un agente terapéutico, como un indicador de inhibición de la red celular de ErbB (o NIS) y los niveles relativos simulados de heterodímeros ErbB2/ErbB3 y ErbB1/ErbB3 demostraron predecir de forma precisa la sensibilidad de líneas de células tumorales al tratamiento con un anticuerpo biespecífico anti-ErbB3 x anti-ErbB2, H3 x B1D2, en un sistema de xenoinjerto *in vivo*.

De forma que la invención se pueda comprender más fácilmente, se definen en primer lugar determinados términos.

Como se usa en el presente documento, el término “agente terapéutico” tiene por objeto abarcar cualquiera y todos los compuestos que tienen una capacidad de disminuir o inhibir la gravedad de los síntomas de una enfermedad o trastorno o aumentar la frecuencia y/o duración de los periodos sin síntomas o con síntomas reducidos en una enfermedad o trastorno o inhibir o prevenir el deterioro o discapacidad debido a una enfermedad o aflicción por trastorno o inhibir o retrasar la progresión de una enfermedad o trastorno o inhibir o retrasar la aparición de una enfermedad o trastorno o inhibir o prevenir la infección en una enfermedad o trastorno infeccioso. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos incluyen moléculas orgánicas pequeñas, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, agentes biológicos modificados por ingeniería genética de forma recombinante, compuestos de ARNi y similares.

Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que “se dirige a un componente dentro de una red celular” se refiere a un agente cuya actividad terapéutica se produce como resultado, al menos en parte, de que el agente tenga un efecto directo o indirecto específico sobre la actividad de un componente dentro de una red celular. Los ejemplos no limitantes de agentes terapéuticos que se dirigen a un componente dentro de una red celular incluyen el anticuerpo monoclonal cetuximab, que se une específicamente a ErbB1, dirigiéndose específicamente por tanto a ErbB1 dentro de la red celular de ErbB y gefitinib, una molécula pequeña que inhibe específicamente el dominio tirosina quinasa (TK) de ErbB1, dirigiéndose específicamente por tanto a ErbB1-TK dentro de la red celular de ErbB.

Como se usa en el presente documento, la expresión “Estado de Activación de Red” o “NAS” se refiere a un indicador, típicamente un valor numérico, que refleja o que corresponde al nivel de activación de una red celular. Un NAS típicamente se calcula usando un modelo computacional de la red celular. Un NAS puede representar, por ejemplo, el nivel simulado de una o más proteínas fosforiladas dentro de una red celular. Aunque uno o más niveles de fosfoproteína son una realización preferida para el NAS (por ejemplo, nivel de pErbB3 como se describe adicionalmente en el Ejemplo 7 o nivel de homodímero o heterodímero de ErbB fosforilado, tal como nivel de heterodímero pErbB1/ErbB3 como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10 o los niveles de quinasas cadena abajo tales como PI3K), otros componentes celulares dentro de una ruta de señalización activada pueden servir como un indicador o indicadores de activación de red y por tanto se pueden usar como el NAS, incluyendo pero sin limitación dimerización de receptor (homodímeros y heterodímeros, tales como niveles de homodímeros ErbB1/ErbB1 o ErbB2/ErbB2 o niveles de heterodímeros ErbB1/ErbB 2, ErbB1/ErbB 3, ErbB1/ErbB 4, ErbB2/ErbB 3 o ErbB2/ErbB 4), escisión de proteína, activación de factores de transcripción y activación de expresión génica. El Estado de Activación de Red de una célula, por ejemplo, una célula tumoral, es un indicador de la dependencia de la célula de esa ruta de señalización, la cual se puede inhibir por un agente terapéutico que se dirige a esa ruta de señalización particular.

Como se usa en el presente documento, la expresión “Estado de Inhibición de Red” o “NIS” se refiere a un indicador, típicamente un valor numérico, que refleja o corresponde al nivel de inhibición de una red celular. Un NIS típicamente se calcula usando un modelo computacional de la red celular. Un NIS puede representar, por ejemplo, el nivel simulado de uno o más componentes dentro de una red celular en la presencia simulada de un agente terapéutico, en comparación con (o con relación a) el nivel o niveles simulados en la ausencia simulada del agente terapéutico. Por ejemplo, el NIS puede ser una proporción del nivel de uno o más componentes en la presencia simulada de un agente terapéutico y el nivel de ese uno o más componentes en la ausencia simulada del agente terapéutico. Un ejemplo no limitante de un NIS es el nivel relativo calculado de uno o más homo o heterodímeros (tales como niveles relativos de heterodímeros ErbB2/3 y ErbB1/3) calculados en la ausencia y presencia simulada de un agente terapéutico (es decir, los niveles en presencia simulada del agente terapéutico en comparación con los niveles en ausencia simulada del agente terapéutico). Sin embargo, se apreciará que otros componentes celulares dentro de una ruta de señalización cuyos niveles se modulan por un agente terapéutico también pueden servir como un indicador o indicadores de inhibición de red y por tanto sus niveles se pueden usar como indicadores del NIS. El NIS de una célula y el NAS de una célula, por ejemplo, una célula tumoral, son indicadores del impacto del agente terapéutico sobre los componentes dentro de una ruta de señalización de la célula y pueden ser predictivos de sensibilidad de la célula a los efectos del agente terapéutico.

La expresión “modelo computacional de una red celular” se refiere a un modelo, tal como un programa informático, que traduce un diagrama de ruta biológica o dibujo (por ejemplo, un conjunto de interacciones de proteína pertinentes a un cáncer) en un conjunto de ecuaciones matemáticas susceptibles de simulación y análisis posterior. Determinada información (por ejemplo, concentraciones de ligando y/o proteína receptora, constantes de velocidad) se puede introducir en el modelo, que luego puede simular información adicional que puede no ser fácilmente medible (por ejemplo, niveles de fosfoproteína). Un Estado de Activación de Red (o NAS) o un Estado de Inhibición de Red (o NIS) de una red celular se puede calcular usando un modelo computacional de la red celular como se describe en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “algoritmo” se refiere en general a un conjunto de instrucciones o procedimientos o fórmulas, para llevar a cabo un método o resolver un problema. La expresión “algoritmo de clasificación estadística” se refiere a un algoritmo que define una relación estadística entre uno o más parámetros

medibles o entradas, (por ejemplo, niveles de proteína medidos en una muestra de tejido) y un resultado particular o salida, (por ejemplo, sensibilidad a un agente terapéutico) de forma que se puede realizar una clasificación o predicción (por ejemplo, respondedoras frente a no respondedoras a un agente terapéutico).

- 5 Como se usa en el presente documento, el término “biomarcador” se refiere a una sustancia (por ejemplo, proteína, ARNm, alelo) dentro de o que se expresa por una célula, donde el biomarcador se correlaciona con la sensibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado.

- 10 Como se usa en el presente documento, el término “biomarcador directo” se refiere a una sustancia (por ejemplo, proteína, ARNm, alelo) dentro de o expresada por una célula, donde el biomarcador directo se correlaciona con la sensibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado y donde la presencia o nivel de esa sustancia se mide directamente en la célula para de ese modo predecir la sensibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado.

- 15 Como se usa en el presente documento, el término “biomarcador indirecto” se refiere a una sustancia (por ejemplo, proteína, ARNm, alelo) dentro de o expresada por, una célula, donde el biomarcador indirecto se correlaciona con la sensibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado y donde la presencia o nivel de esa sustancia no se mide directamente en la célula, sino que se determina mediante medios indirectos, tal como mediante simulación usando un modelo computacional, para predecir de ese modo la sensibilidad de la enfermedad a un tratamiento dado.

- 20 Un “anticuerpo”, como se usa en el presente documento es una proteína que consiste en uno o más polipéptidos que comprenden dominios de unión codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina, donde la proteína se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como también la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, las cuales a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Una unidad estructural de inmunoglobulina típica comprende un tetrámero que está compuesto de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kD) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kD). “V_L” y “V_H” se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

- 30 Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas así como también fragmentos de unión a antígeno de las mismas, los cuales se pueden producir mediante digestión con diversas peptidasas o sintetizarse *de novo* químicamente o usando tecnología de ADN recombinante. Tales fragmentos incluyen, por ejemplo, dímeros F (ab)₂ y monómeros Fab. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos de cadena única (anticuerpos que existen como una cadena polipeptídica única), más preferentemente anticuerpos Fv de cadena única (scFv) en los cuales una cadena V_H y una V_L se unen (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. 5.132.405 y 4.956.778).

- 40 “Inmunoespecífico” o “inmunoespecíficamente” se refieren a anticuerpos que se unen, a través de dominios sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina, a uno o más epítopos de una proteína de interés, pero que no reconocen ni se unen sustancialmente a otras moléculas en una muestra que contiene una población mixta de moléculas antigénicas. Típicamente, un anticuerpo se une a un antígeno afín con una K_d de al menos 50 nM, como se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. El uso de tales ensayos se conoce bien en la técnica y se ilustra en el Ejemplo 13, en el presente documento.

- 50 Un “anticuerpo anti-ErbB3” es un anticuerpo aislado que se une inmunoespecíficamente al ectodominio de ErbB3. Tal unión a ErbB3 muestra al menos una K_d de 50 nM medida mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. Se prefieren los anticuerpos anti-ErbB3 que inhiben la fosforilación mediada por ligando similar a EGF de ErbB3. Los ligandos similares a EGF incluyen EGF, TGFα, betacelulina, factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, birregulina, epigen, epirregulina y anfirregulina, que típicamente se unen a ErbB1 e inducen heterodimerización de ErbB1 con ErbB3.

- 55 El término “biespecífico” como se usa en el presente documento se refiere una proteína que comprende dos sitios de unión a antígeno, un primer sitio de unión que tiene una afinidad por un primer antígeno o epítipo y un segundo sitio de unión que tiene afinidad de unión por un segundo antígeno o epítipo diferente al primero.

- 60 Como se usa en el presente documento, el término “sujeto” o “paciente” incluye cualquier animal humano o no humano que tiene una enfermedad o trastorno para la cual se puede predecir la respuesta al tratamiento con un agente terapéutico usando los métodos de la invención, tal como un sujeto o paciente con un tumor. El término “animal no humano” incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, etc.

- 65 Muchos métodos descritos en el presente documento utilizan uno o más sistema o sistemas informáticos, tales como ordenadores de fines especiales y de fines generales que incluyen diversos hardware informáticos, tales como dispositivos de entrada, dispositivos de salida, procesadores, medios de almacenamiento y otros componentes

informáticos correspondientes.

También se describen en el presente documento medios de almacenamiento legibles por ordenador que tienen instrucciones ejecutables por ordenador o estructuras de datos almacenadas en los mismos (incluyendo las instrucciones y estructuras de datos definidas en el presente documento, tales como los modelos computacionales mecanicistas, los niveles de proteína y biomarcador medidos, algoritmos de clasificación, estados de mutación y así sucesivamente) y que se configuran específicamente para implementar los procesos descritos y reivindicados en el presente documento. Tales medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden ser cualquier medio disponible al que se pueda acceder por un ordenador de fines generales o fines especiales. A modo de ejemplo y sin limitación, tales medios de almacenamiento legibles por ordenador pueden comprender RAM, ROM, EEPROM, CD-ROM u otro almacenamiento de disco óptico, almacenamiento de disco magnético u otros dispositivos de almacenamiento magnético o cualquier otro medio que se pueda usar para almacenar medios de código de programa, módulos y software deseados en forma de instrucciones ejecutables por ordenador o estructuras de datos y a los que se puede acceder por un ordenador de fines generales o de fines especiales.

En algunos casos, los medios de transmisión también se pueden usar para portar las instrucciones ejecutables por ordenador, de forma que la presente invención también se extiende a aplicaciones, sistemas y otras realizaciones que incorporan medios de transmisión que portan las instrucciones ejecutables por ordenador que se ejecutan para llevar a cabo uno o más de los procesos descritos en el presente documento. Cuando se transfiere información o se proporciona a lo largo de una red u otra conexión de comunicaciones (ya sea cableada, inalámbrica o una combinación de cableada e inalámbrica) a un ordenador, el ordenador considera de forma apropiada la conexión como un medio de transmisión legible por ordenador.

Las expresiones “instrucciones ejecutables por ordenador”, “instrucciones ejecutables”, “módulos” y “módulos informáticos”, se usan algunas veces de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia al código de ordenador, estructuras de datos y software a los que se accede y que se ejecutan por uno o más procesadores informáticos y componentes de procesamiento de uno o más sistemas informáticos para implementar determinados procesos, como se describe dentro de este documento.

Aspectos adicionales con respecto a lo anterior y diversos aspectos adicionales de la presente divulgación se describen con mayor detalle en las siguientes sub-secciones, que no se han de interpretar como limitantes.

I. Modelos computacionales mecanicistas

Los modelos computacionales mecanicistas se pueden ver como descripciones matemáticas predictivas de las interacciones moleculares en una red de proteínas. Al menos en determinadas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento para predecir respuestas frente a agentes terapéuticos implican el uso de un modelo computacional mecanicista. Los modelos computacionales mecanicistas traducen un diagrama o dibujo de una ruta biológica (por ejemplo, un conjunto de interacciones de proteínas que se producen a lo largo de una ruta de transducción de señal, tal como una ruta pertinente para el cáncer) en un conjunto de ecuaciones matemáticas susceptibles de simulación y análisis posterior. Por tanto, la primera etapa en la construcción del modelo es la generación de una representación detallada de un diagrama o dibujo de la ruta biológica que incluye las proteínas y moléculas pertinentes implicadas en la ruta. Se tienen que tomar decisiones críticas con respecto a cuáles proteínas y moléculas se han de incluir, así como también las reacciones biológicas que las conectan. La información disponible en la bibliografía científica acerca de cuáles proteínas y moléculas están implicadas en la ruta y cuáles reacciones biológicas las conectan se recoge y se usa en la generación de la representación de dibujo de la ruta biológica.

Una vez que la representación de dibujo de la ruta biológica se ha generado, esta información se traduce a un sistema de ecuaciones que representa las interacciones proteína-proteína dentro de la ruta, también denominado red celular. Los modelos computacionales que representan las redes de reacción bioquímica de redes de transducción de señal se basan en, por ejemplo, ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales (EDO), modelos estocásticos, modelos lógicos booleanos o difusos o redes de petri. Estos se componen de ecuaciones diferenciales que requieren dos tipos de parámetros que se deben medir o estimar experimentalmente: número de especie inicial ($c_{0,i}$ para la especie i^{th}) y las constantes de velocidad (k_i para la velocidad j^{th}). En las Figuras 4A-D se muestra un diagrama esquemático del proceso de construcción de un modelo computacional, que ilustra un diagrama de dibujo de la ruta de señalización de ErbB (Figura 4A), la producción de esta ruta en conjuntos de reacciones bioquímicas y flujos (Figuras 4B y 4C) y representación de las interacciones proteína-proteína mediante un conjunto de ecuaciones diferenciales (Figura 4D).

El modelo computacional típicamente se construye como un conjunto de instrucciones ejecutables escritas en un lenguaje de programación informática, por ejemplo utilizando el software Simbiology de MATLAB (The MathWorks, Natick, MA), opcionalmente junto con el software de modelado The Systems Biology Toolbox 2 para MATLAB (SBtoolbox2.org) o JACOBIAN (Numérica Technology, Cambridge, MA). Sin embargo, se contempla el desarrollo y uso de modelos computacionales, contruidos con software e interfaces diferentes a aquellos contruidos con software e interfaces MATLAB o JACOBIAN. Se pueden utilizar modelos computacionales que se han construido

previamente por una fuente de terceros y descargado en el sistema informático que implementan otros aspectos de los métodos descritos.

Antes de la calibración de modelo, se especifican e introducen los valores de tantos parámetros como sea posible en el sistema informático, en base a información a partir de la bibliografía científica, por ejemplo, niveles de proteína, afinidades de unión, constantes de velocidad de unión de ligandos a sus receptores afines. Los valores de parámetros que no están disponibles en la bibliografía científica se pueden obtener experimentalmente.

El modelo se “entrena” optimizando su salida frente a los datos obtenidos experimentalmente que se introducen en un sistema informático que realiza el entrenamiento. Mediante el ajuste del modelo a los datos experimentales, se selecciona el conjunto de parámetros de modelo óptimo. El proceso de calibración de modelo implica la modificación de las hipótesis y los estimados de parámetros. Para calibrar el modelo, en primer lugar se debe identificar un subconjunto de proteínas y parámetros que son especialmente importantes biológicamente para traducir un estímulo de ligando a un acontecimiento de señalización cadena abajo. Este proceso se denomina análisis de sensibilidad, que, de forma más precisa, es una herramienta matemática que mide el cambio en una salida, tal como fosforilación de sustrato, en respuesta a cambios en las concentraciones de proteína y parámetros cinéticos dentro de la ruta. La sensibilidad completamente normalizada ($s_{ij}(t)$) de la i^{th} observable $c_i(t)$ con respecto a un cambio en la constante de velocidad (k_j) de j^{th} viene dada por la siguiente ecuación:

$$s_{ij}(t) \equiv \frac{\partial \ln(c_i(t))}{\partial \ln(k_j)}$$

A continuación se lleva a cabo la calibración de modelo mediante un sistema informático usando métodos de optimización locales y globales (tales como, pero sin limitación, Algoritmos Genéticos, hibridación simulada, optimización de Levenberg-Marquardt y así sucesivamente) que minimizan la distancia entre los datos experimentales y los resultados de simulación mediante la variación de los parámetros y las concentraciones de proteína iniciales identificadas en el análisis de sensibilidad. El sistema informático se puede configurar para variar automáticamente los parámetros durante la calibración o para variar los parámetros únicamente como respuesta a entrada de usuario añadida incrementalmente.

En la bibliografía científica se han descrito varios modelos computacionales para diversas rutas de señalización (véanse, por ejemplo, Kholodenko, B. N. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 30169-30181; Schoeberl, B. *et al.* (2002) *Nat. Biotech.* 20: 370-375; Hayakeyama, M. *et al.* (2003) *Biochem. J.* 373: 451-463; Nielsen, U. B. y Schoeberl, B. (2005) *IDrugs* 8: 822-826; Schoeberl, B. *et al.* (2006) *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 1: 53-54; Schoeberl, B. *et al.* (2006) *IBM J. Res. Dev.* 50: 645; Fitzgerald, J. B. *et al.* (2006) *Nat. Chem. Biol.* 2: 458-466; Kholodenko, B. N. (2007) *Nat. Cell. Biol.* 9: 324-330; Birtwistle, M. R. *et al.* (2007) *Molecular Systems Biology* 3: 144; Hinow, P. *et al.* (2007) *Theoretical Biology and Medical Modelling* 4: 14). Adicionalmente, la construcción y uso de modelos computacionales se revisa en Kholodenko, R. N. (2006) *Nature Reviews: Mol Cell. Biol.* 7: 165-176 y Kumar, N. *et al.* (2006) *Drug Discovery Today* 11: 806-811.

Uno de los modelos computacionales usados en determinados métodos descritos en el presente documento es un modelo de una ruta de señalización de ErbB. La construcción de un modelo computacional representativo de la ruta de señalización de ErbB se describe con detalle en el Ejemplo 4. Como se usa en el presente documento, la expresión “ruta de señalización de ErbB” tiene por objeto abarcar rutas de transducción de señal que se inician a través de la interacción de un ligando con un receptor de la familia de ErbB. Los componentes dentro de una ruta de señalización de ErbB pueden incluir: (i) uno más ligandos, ejemplos de los cuales incluyen HRG, betacelulina (BTC), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina (HB-EGF), factor de crecimiento transformante alfa ($TGF\alpha$), anfirregulina (AR), epigen (EPG) y epirregulina (EPR); (ii) uno o más receptores, ejemplos de los cuales incluyen ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4; y (iii) quinasas, fosfatasa y sustratos intracelulares, ejemplos de los cuales incluyen fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), fosfatidilinositol bifosfato (PIP2), fosfatidilinositol trifosfato (PIP3), fosfatasa y homólogo de tensina (PTEN), isozima de piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), AKT, RAS, RAF, MEK, la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), proteína fosfatasa 2A (PP2A) y proteína tirosina quinasa SRC.

Otro modelo computacional usado en determinados métodos descritos en el presente documento es un modelo de una ruta de señalización de IGF1R. Como se usa en el presente documento, la expresión “ruta de señalización de IGF1R” tiene por objeto abarcar rutas de transducción de señal que se inician a través de la interacción de un ligando con un receptor de la familia del factor de crecimiento de insulina 1. Los componentes dentro de una ruta de señalización de IGF1R pueden incluir: (i) uno o más ligandos, ejemplos de los cuales incluyen factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1); (ii) uno o más receptores, ejemplos de los cuales incluyen IGF1R y el receptor de insulina; (iii) una o más proteínas de unión a IGF y (iv) quinasa y sustratos intracelulares, ejemplos de los cuales incluyen sustrato 2 del receptor de insulina (IRS2), PI3K, AKT, proteína relacionada con Bcl-2 BAD, RAS, RAF, MEK y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).

Otro modelo computacional usado en determinados métodos descritos en el presente documento es un modelo de una ruta de señalización de c-Met. Como se usa en el presente documento, la expresión "ruta de señalización de c-Met" tiene por objeto abarcar rutas de transducción de señal que se inician a través de la interacción de un ligando con una proteína tirosina quinasa receptora de c-Met. Los componentes dentro de una ruta de señalización de c-Met pueden incluir: (i) uno o más ligandos, ejemplos de los cuales incluyen factor de crecimiento de hepatocitos (HGF); (ii) uno o más receptores, ejemplos de los cuales incluyen la proteína tirosina quinasa receptora de c-Met; y (iii) quinasas y sustratos intracelulares, ejemplos de los cuales incluyen PI3K, proteína unida al factor de crecimiento 2 (GRB2), Src homólogo y proteína de colágeno (SHC), proteína tirosina quinasa SRC y proteína de almacén GAB1, así como también proteína RAS, RAF, MEK y proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK).

Aún otro modelo computacional usado en determinados métodos descritos en el presente documento es un modelo que comprende cualquier combinación de dos o más rutas de señalización de factor del crecimiento, tales como la señalización de receptor de IGF1R y ErbB, la señalización de receptor ErbB y la señalización de c-Met o la señalización de IGF1-R, ErbB y c-Met en combinación.

A pesar de la especificidad de los ejemplos anteriores, se apreciará que también se pueden incorporar otros modelos computacionales (por ejemplo, para rutas de señalización tales como TNF, IL-2, PDGF, FGF, TRAIL, integrinas, citoquinas y prácticamente cualquier otra ruta) y utilizarse mediante los métodos descritos en el presente documento.

La presencia de uno o más agentes terapéuticos se puede simular en el modelo computacional. Una representación computacional del agente o agentes terapéuticos se puede construir usando ecuaciones de reacción de acción de masas que describen la unión del agente o agentes a su diana celular o que de otra manera describen el efecto del agente o agentes sobre la ruta celular que se está modelando. Los parámetros para los acontecimientos de unión, u otros efectos biológicos, se pueden obtener mediante mediciones experimentales directas, así como también mediante entrenamiento del modelo para que coincida con los datos del efecto del agente terapéutico sobre la célula. Por ejemplo, para agentes de anticuerpo, la asociación y disociación de la unión del anticuerpo a su antígeno diana se pueden determinar experimentalmente mediante métodos convencionales (tales como tecnología BIAcore o KinExA) y esos parámetros se pueden incorporar en el modelo computacional. Adicionalmente, por ejemplo, para agentes biespecíficos, se puede usar un parámetro de entrecruzamiento, como una medida del número de moléculas biespecíficas unidas a cada diana individual del biespecífico o a ambas dianas del biespecífico, como un parámetro de entrenamiento para el modelo computacional. El parámetro de entrecruzamiento se puede obtener tomando la afinidad de unión observada global (determinada mediante análisis FACS convencional) y ajustándola a una ecuación de unión logística convencional. Además de lo anterior, los parámetros adicionales que pueden ser farmacéuticamente pertinentes para un agente terapéutico particular y que por tanto se han de representar en el modelo computacional, se conocen por los expertos.

Cuando el efecto de un agente terapéutico se tiene que representar en el modelo computacional, se puede modelar un agente único o se pueden modelar múltiples agentes en combinación para de esa forma simular el efecto de la terapia de combinación sobre las respuestas celulares. Por ejemplo, dos anticuerpos donde cada uno se une a antígenos diana diferentes se pueden representar en el modelo computacional o se pueden representar simultáneamente un anticuerpo que se dirige a una ruta de señalización particular (por ejemplo, una ruta de ErbB) y un inhibidor de molécula pequeña de la misma ruta de señalización (por ejemplo, una ruta de ErbB) en el modelo computacional para evaluar el efecto de tal terapia de combinación sobre la ruta de señalización en la célula.

II. Algoritmos de clasificación estadística

Los métodos descritos en el presente documento para predecir respuestas frente a agentes terapéuticos (por ejemplo, generando respuestas predichas frente a agentes terapéuticos con un ordenador) y los métodos para tratar pacientes que tienen tumores malignos implican el uso de uno o más algoritmos de clasificación estadística.

Un objetivo de un modelo estadístico es discernir una relación entre, por ejemplo, los niveles de proteína medidos en muestras de tejido, así como también los niveles de activación (por ejemplo, el Estado de Activación de Red o "NAS") o los niveles de inhibición (por ejemplo, el Estado de Inhibición de Red o "NIS") calculados mediante el modelo bioquímico, por una parte y la respuesta del paciente frente a un agente terapéutico por otra. Por tanto, un algoritmo de clasificación estadística define una relación estadística entre uno o más parámetros medibles o entradas (por ejemplo, niveles de proteína medidos en una muestra de tejido, valores de NAS o NIS calculados) y un resultado particular o salida, (por ejemplo, sensibilidad a un agente terapéutico) de forma que se puede realizar una clasificación o predicción (por ejemplo, respondedores frente a no respondedores a un agente terapéutico). Por consiguiente, un modelo estadístico ayuda a identificar el umbral que divide a los respondedores y a los no respondedores y también ayuda a definir la incertidumbre alrededor del umbral definido.

Diversos tipos de sistemas clasificadores estadísticos se han descrito en la técnica y pueden ser adecuados para su uso en los métodos descritos, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen análisis de componente principal (PCA), regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), PLSR trilineal, lógica difusa e inferencia Bayesiana, bosque aleatorio (RF), árbol de clasificación y regresión (C&RT), árbol impulsado, red neuronal (NN), máquina de soporte

vectorial (SVM), modelo detector de interacción automática de chi cuadrado general, árbol interactivo, Splines Adaptativas de Regresión, clasificador de aprendizaje de máquina y combinaciones de los mismos. Véase por ejemplo la Publicación PCT WO 2007/109571.

5 Para entrenar un algoritmo de clasificación estadística, en una realización preferida, para usar los términos de la técnica: la “máquina” o “sistema informático” (por ejemplo, ordenador) “aprende” la relación entre el nivel de expresión de la proteína y el estado de activación de red (NAS) con la respuesta real del paciente (por ejemplo, respondedor, no respondedor) mediante el examen de una serie de ejemplos de “entrenamiento” que se han aportado al ordenador por medio del “clasificador” (algoritmo estadístico). Este proceso se conoce como
10 “aprendizaje supervisado”, ya que existe un conjunto de muestras para las cuales tanto la entrada (niveles de proteína, medidos y calculados) como la salida (por ejemplo, respuesta a un agente terapéutico) se conoce *a priori*. Una parte integral de la aplicación de un algoritmo de clasificación estadística es la selección de características informativas (siendo una característica cualquier nivel de proteína o nivel de activación de proteína medido o calculado), así como también la determinación del umbral óptimo para la puntuación producida por el algoritmo.

15 Generalmente se prefiere validar un algoritmo de clasificación estadística en un “conjunto de ensayo” separado de muestras, para los cuales se conoce el resultado, pero no se le desvela al clasificador. Mediante la comparación de predicciones con resultados conocidos, se puede medir el rendimiento. Cuando el número de muestras es pequeño, esto puede no ser práctico y se han establecido técnicas para evadir este requisito. La principal entre ellas es la validación cruzada, que se describe adicionalmente más adelante. El resultado de un clasificador es una puntuación que se puede traducir a una predicción de clase si se desea. En general, el proceso de entrenamiento de un clasificador también incluye métodos para determinar los umbrales óptimos.

25 Con el fin de ensayar la capacidad de realizar predicciones, el procedimiento general en la validación cruzada es poner a un lado una parte de los datos (una fracción de las muestras) como “datos de entrenamiento” o el “conjunto de (datos) entrenamiento”; los datos restantes se denominan “conjunto de (datos) de ensayo”. Típicamente, este procedimiento se repite muchas veces, utilizando cada vez una fracción diferente de los datos para entrenamiento y ensayo. Un conjunto de entrenamiento más grande es claramente beneficioso (a mayor cantidad de ejemplos, mejor clasificador), pero también lo es un conjunto de ensayo grande (mientras mayor cantidad de predicciones se puedan verificar, más elevada será la confianza en predicciones futuras). Cuando el tamaño de la muestra es pequeño, este
30 procedimiento se puede modificar de forma de que una muestra única se separa a un lado como datos de ensayo y el clasificador se entrena usando todas las muestras restantes. Se realiza una predicción en la muestra que se ha dejado fuera única. Esto se denomina “validación cruzada dejando uno fuera (leave-one-out)” (LOOCV) y está bien establecida en la técnica. Este procedimiento se repite para cada muestra dejada fuera a su vez. Una vez que todas
35 las predicciones se han realizado, se evalúa el rendimiento.

En los algoritmos de clasificación estadística usados en los métodos descritos, se pueden usar diversos parámetros o características informativas o piezas de información, como los datos de entrada. Los ejemplos no limitantes de tales datos de entrada incluyen niveles de proteína de uno o más componentes de una red celular obtenidos a partir
40 de una muestra celular, un Estado de Activación de Red (NAS) o Estados de Inhibición de Red (NIS) calculados usando un modelo computacional, el estado de mutación de una o más proteínas en la muestra celular, la edad del sujeto para el cual se está investigando la sensibilidad al tratamiento y el género del sujeto para el cual se está investigando la sensibilidad al tratamiento.

45 III. Medición de los niveles de componentes celulares en una muestra de células

En los métodos descritos en el presente documento para generar sensibilidad a tratamiento con un agente terapéutico predicha y para tratar a un paciente que tiene un tumor maligno, un procedimiento implica típicamente medir, en una muestra de células, los niveles de uno o más componentes de una red celular o, como alternativa,
50 introducir los niveles medidos de uno o más componentes de una red celular, que se han obtenido a partir de mediciones tomadas a partir de una muestra de células, en un sistema informático. Por ejemplo, una muestra de un tumor se puede obtener mediante métodos convencionales a partir de un paciente con el tumor y los niveles de uno o más componentes de una red celular se pueden medir en la muestra del tumor.

55 La entrada se puede introducir manualmente en el sistema informático. La entrada también se puede introducir automáticamente o descargarse al sistema informático, en algunos casos, tal como cuando se conectan dispositivos de medición computarizados al sistema informático que recibe y utiliza la entrada para implementar características de la invención. A este respecto, también se apreciará que cualquier información de medición y cualquier información de estado (por ejemplo, información de estado de mutación), así como también cualquier otro dato de
60 tejido/paciente, descrito en este documento se puede obtener a través del uso de dispositivos computarizados que automáticamente obtienen y descargan la información de medición y estado a uno o más sistemas informáticos diferentes que usan los datos para llevar a cabo los procesos descritos.

65 Como se usa en el presente documento, el término “nivel” de un componente se refiere a la cantidad o concentración del componente presente en una muestra. Los niveles de componentes se pueden medir usando cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas. El nivel típicamente se determina midiendo los niveles de

proteína, pero alternativamente el nivel se puede determinar en algunos casos midiendo los niveles de ARNm, lo cual puede estar seguido de conversión de los niveles de ARNm en niveles de proteína predichos. Los niveles de proteína (por ejemplo, monómeros, homodímeros o heterodímeros) se pueden medir usando una o más técnicas bien conocidas en la técnica, ejemplos no limitantes de las cuales incluyen separación de células activadas por fluorescencia cuantitativa (qFACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, Luminex), inmunohistoquímica (IHC), inmunohistoquímica cuantitativa (qIHC), métodos basados en proximidad (por ejemplo, métodos basados en transferencia de energía de resonancia de Forster, complementación de fluorescencia biomolecular (BiFC), VeraTag™ o DNA-Programmed Chemistry™ (DPC™)), espectrometría de masas, ensayo de Western (inmunotransferencia) y coimmunoprecipitación. Los niveles de proteína se pueden expresar como pg detectados de proteína/μg de proteína total.

Los niveles de proteína o de ARNm se pueden determinar en lisados celulares. Los lisados celulares se pueden preparar, por ejemplo, como se ha descrito con detalle en el Ejemplo 2. Además, los ejemplos ilustrativos del uso de ELISA para determinar los niveles de proteína se describen con detalle en los Ejemplos 2 y 4, un ejemplo ilustrativo del uso de qFACS para determinar los niveles de proteína se describe con detalle en el Ejemplo 4 y un ejemplo ilustrativo de la medición de los niveles de ARNm y la conversión en niveles de proteína se describe con detalle en el Ejemplo 4 (para HRG-β1).

La muestra de tumor puede ser, por ejemplo, una muestra de células frescas, una muestra congelada fresca o una muestra de tejido fijada. Para muestras de tejido de paciente, los bloques de tejido archivados se pueden acceder más fácilmente que las muestras congeladas frescas. Por tanto, en una realización preferida, se usa una muestra de tejido incrustada en parafina fijada con formalina (FFPE) y el nivel de los componentes (por ejemplo, ligandos, receptores) se puede determinar mediante inmunohistoquímica semicuantitativa (IHC) (descrita adicionalmente en el Ejemplo 9). Para convertir la información de IHC semicuantitativa en una concentración susceptible de introducirse en un modelo computacional, se puede comparar un portaobjetos de control que contiene tapones celulares o xenoinjertos con niveles de expresión de receptor y/o ligando conocidos con la muestra del paciente. Además, los factores de conversión se pueden determinar para convertir un nivel de expresión obtenido en unidades sin dimensiones (por ejemplo, cantidades de proteína o ARNm) en un nivel de concentración que se puede introducir en un modelo computacional, descrito con mayor detalle en el Ejemplo 4 para los niveles de expresión de BTC y HRG.

Los niveles de ARNm de ligando y de proteína de ligando generalmente se correlacionan razonablemente bien. Por lo tanto, se puede usar qRT-PCR para determinar los niveles de expresión de ARNm en lisados celulares a partir de líneas de células tumorales y xenoinjertos así como también a partir de FFPE.

IV. Métodos para predecir respuestas a agentes terapéuticos

Se describen métodos para predecir la respuesta de células a tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente dentro de una red celular. Tales métodos comprenden generalmente los elementos indicados más adelante en Métodos Predictivos 1-5.

Método predictivo 1

- (a) obtener mediciones de niveles de uno o más componentes de la red celular, midiendo el nivel o niveles presentes en una muestra de las células de uno o más componentes de la red celular y
- (b) aplicar un método implementado por ordenador que comprende:

- (i) calcular un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional de la entrada de red celular con las mediciones; y
- (ii) calcular y dar salida a una respuesta predicha de las células frente al tratamiento con el agente terapéutico basada, al menos en parte, en el NAS o el NIS calculados en (i).

Método predictivo 2

- (a) medir, en una muestra de las células, los niveles de uno o más componentes de la red celular y
- (b) aplicar un método implementado por ordenador que comprende:

- (i) calcular un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional de la red celular;
- (ii) aplicar un algoritmo de clasificación estadística; y
- (iii) predecir la respuesta de las células frente a tratamiento con el agente terapéutico en base, al menos en parte, al resultado del algoritmo de clasificación estadística.

Método predictivo 3

- a) un sistema informático que recibe, a través de un dispositivo de entrada, entrada que identifica los niveles de uno o más componentes en una red celular medidos en una muestra de las células;

- b) el sistema informático que calcula un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional de la red celular; y
 c) el sistema informático que genera y a partir de entonces produce en un dispositivo de salida, una respuesta predicha de la célula frente al tratamiento con el agente terapéutico en base, al menos en parte, al NAS o el NIS calculados en b).

Método predictivo 4

- a) medir, en una muestra de las células, los niveles de uno o más componentes de la red celular;
 b) calcular un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional de la red celular;
 c) aplicar un algoritmo de clasificación estadística; y
 d) predecir la repuesta de las células al tratamiento con el agente terapéutico en base, al menos en parte, al resultado del algoritmo de clasificación estadística.

Método predictivo 5

- a) un sistema informático que recibe, a través de un dispositivo de entrada, entrada que identifica los niveles de uno o más componentes en una red celular medidos en una muestra de las células;
 b) el sistema informático que calcula un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional de la red celular;
 c) el sistema información que aplica un algoritmo de clasificación estadística; y
 d) el sistema informático que genera y a partir de entonces produce en un dispositivo de salida, una respuesta predicha de las células al tratamiento con el agente terapéutico en base al resultado del algoritmo de clasificación estadística.

Los métodos anteriores pueden, pero no necesitan, comprender adicionalmente tratar células o un paciente a partir del cual se obtienen las células, con un agente terapéutico, en base a la sensibilidad predicha de las células frente al agente terapéutico.

Los niveles del componentes o componentes detectados pueden servir para indicar la eficacia predicha de uno o más agentes terapéuticos específicos. En muchos casos, esto significa que si el componente o los componentes se detectan a un nivel (o a una proporción de concentración particular con relación a otros componentes especificados) que satisface un criterio de estar por encima (o en algunos casos por debajo) de un nivel de corte o proporción predeterminado, entonces se predice que un agente terapéutico dado será eficaz y se administra al paciente y si el componente o los componentes se detectan a un nivel o proporción de concentración que no satisfacen el criterio con relación al nivel o proporción de corte predeterminado, entonces el agente terapéutico no se administra al paciente. Los niveles de corte apropiados se pueden establecer usando prácticas de rutina y como se describe en el presente documento.

Para predecir la respuesta de las células, los valores de NAS o NIS típicamente se calculan para una pluralidad de células respondedoras y células no respondedoras conocidas frente al agente terapéutico y estos valores a partir de las células respondedoras y las células no respondedoras conocidos se usan para establecer los valores de NAS o NIS de umbral, indicando sensibilidad o no sensibilidad frente al agente terapéutico (descrito adicionalmente en los Ejemplos 7 y 10). Por tanto, la respuesta generada y/o predicha de las células al tratamiento se puede obtener en c) comparando el NAS o NIS calculado en b) con los valores de NAS o NIS de umbral, lo que indica sensibilidad o no sensibilidad al agente terapéutico.

Para aplicar el algoritmo de clasificación estadística, uno o más trozos de información se introducen en el algoritmo o el sistema informático incorpora uno o más trozos de información en el algoritmo. Por ejemplo, este procedimiento puede comprender introducir en el algoritmo uno o más trozos de información seleccionados entre (i) los niveles de uno o más componentes de la red celular; (ii) el NAS o NIS calculado (iii) el estado de mutación de uno o más genes en la muestra de las células; (iv) la edad del sujeto que se tiene que tratar con el agente terapéutico; (v) el género del sujeto que se tiene que tratar con el agente terapéutico; (vi) presencia o ausencia de receptor de estrógenos (RE) en las células; (vii) presencia o ausencia de receptor de progesterona en las células; y (viii) presencia o ausencia de receptor de andrógenos en las células. Adicionalmente o como alternativa, la aplicación del algoritmo de clasificación estadística puede comprender el sistema informático que calcula el algoritmo después de introducir uno o más trozos de información expuestos en (i)-(viii) anteriormente. Debido a que el algoritmo de clasificación estadística define una relación estadística entre la información de entrada y la sensibilidad de las células (por ejemplo, células tumorales) al tratamiento, la predicción de la respuesta de las células al tratamiento puede entonces basarse en el resultado del algoritmo de clasificación estadística.

Para los métodos predictivos y otros métodos descritos en el presente documento, una red celular preferida comprende una ruta de señalización de ErbB. El uno o más componentes medidos e introducidos en el sistema informático en el método pueden comprender uno o más ligandos implicados en la ruta de señalización de ErbB. Los ejemplos no limitantes de tales ligandos incluyen HRG (incluyendo HRG- β 1, HRG- β 2, HRG- α , HRG-3 y HRG-4),

BTC, EGF, HB-EGF, TGF α , AR, EPG y EPR. Adicionalmente o como alternativa, el uno o más componentes medidos en el método pueden comprender uno o más receptores implicados en la ruta de señalización de ErbB. Los ejemplos no limitantes de tales receptores incluyen ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 (también conocidos en la técnica como HER1, HER2, HER3 y HER4, respectivamente). Tales receptores se pueden ensayar como entidades individuales (ya sea que ocurran en monómeros, homodímeros o heterodímeros) y en determinadas realizaciones cada homodímero y heterodímero también se puede medir como un componente distinto e introducirse en el sistema informático. Por ejemplo, los componentes medidos pueden ser 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más receptores, ligandos o ambos, elegidos entre ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, HRG y BTC (por ejemplo, ErbB1 y HRG; o ErbB1, ErbB2 y ErbB3). Por ejemplo, en algunos métodos, el NAS calculado simula el nivel de homodímero ErbB2/ErbB2 o heterodímero ErbB2/ErbB3 en ausencia del agente terapéutico. En otros de tales métodos, el NIS calculado simula el nivel de heterodímero ErbB2/ErbB3 o heterodímero ErbB1/ErbB3 en presencia del agente terapéutico en comparación con los niveles de heterodímero ErbB2/ErbB3 o heterodímero ErbB1/ErbB3 en ausencia del agente terapéutico.

En algunos de los métodos anteriores, el NAS calculado simula los niveles de una o más proteínas fosforiladas en la ruta de señalización de ErbB3. Por ejemplo, el NAS que se calcula puede simular los niveles de pErbB3 en la muestra de las células. En realizaciones alternativas, el NAS que se calcula puede simular el nivel de un heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado o un heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado en la muestra de las células.

En un método descrito, el agente terapéutico comprende un anticuerpo anti-EGFR (anti-ErbB1), un ejemplo ilustrativo del cual es el anticuerpo anti-ErbB1 cetuximab (Erbix[®], ImClone Systems). Otros ejemplos de anticuerpos anti-ErbB1 incluyen matuzumab, panitumumab, nimotuzumab y mAb 806 (Mishima, K. *et al.* (2001) Cancer Res. 61: 5349- 5354). En otro método descrito, el agente terapéutico comprende un anticuerpo anti-ErbB2, un ejemplo ilustrativo del cual es trastuzumab (Herceptin[®], Genentech).

La invención proporciona un agente terapéutico que comprende un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método para tratar un paciente que tiene un tumor neoplásico, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo anti-ErbB3 al paciente si el nivel de ErbB3 fosforilado (pErbB3) en una muestra del tumor obtenido a partir del paciente se determina que no es menor de 0,064 pg/ μ g de proteína total. En una realización preferida, el anticuerpo anti-ErbB3 comprende MM-121, que actualmente está siendo sometido a ensayos clínicos de Fase I. En una realización preferida, el anticuerpo anti-ErbB3 comprende Ab N° 6, descrito adicionalmente en el documento WO 2008/100624 y que tiene las secuencias de V_H y V_L de SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo anti-ErbB3 es un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 6 de SEC ID N°: 7-9 (CDR1, 2, 3 de V_H) y 10-12 (CDR1, 2, 3 de V_L), respectivamente. Otros ejemplos de anticuerpos anti-ErbB3 incluyen Ab N° 3, Ab N° 14, Ab N° 17 y Ab N° 19, que se describen también adicionalmente en el documento WO 2008/100624 y que tienen las secuencias de V_H y V_L de SEC ID N°: 3 y 4, 5 y 6, 25 y 26 y 33 y 34, respectivamente. En otra realización, el anticuerpo anti-ErbB3 es un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 3 (SEC ID N°: 13-15 y 16-18, respectivamente) o anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 14 (SEC ID N°: 19-21 y 22-24, respectivamente) o anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 17 (SEC ID N°: 27-29 y 30-32, respectivamente) o anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 19 (SEC ID N°: 35-37 y 38-40, respectivamente).

Otros ejemplos de anticuerpos anti-ErbB3 incluyen los anticuerpos 1B4C3 y 2D1D12 (U3 Pharma AG), los cuales se describen en la Publicación de Estados Unidos N° 2004/0197332 y los anticuerpos monoclonales (incluyendo las versiones humanizadas de los mismos), tales como 8B8 descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.968.511.

En otra realización, el anticuerpo anti-ErbB3 es un anticuerpo biespecífico (por ejemplo, una proteína de fusión) que comprende un anticuerpo anti-ErbB3 enlazado a un segundo anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo anti-ErbB2). Un ejemplo preferido de un anticuerpo biespecífico de este tipo es H3 x B1D2, cuya secuencia de aminoácido se expone en SEC ID N°: 41. En este anticuerpo biespecífico, un anticuerpo de cadena única que se une a ErbB3, denominado H3 (que tiene las CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 42-44 y 45-47, respectivamente) se enlaza a un anticuerpo de cadena única que se une a ErbB2, denominado B1D2 (que tiene las CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 48-50 y 51-53, respectivamente). Los componentes de anticuerpo del anticuerpo biespecífico H3 x B1D2 se describen adicionalmente en las Patentes de Estados Unidos N° 7.332.585 y 7.332.580, así como también la Solicitud PCT PCT/US2006/023479 (publicada como el documento WO 2007/084181) y Solicitud PCT PCT/US2007/024287 (publicada como el documento WO 2008/140493).

En aún otra realización, el agente terapéutico comprende dos o más anticuerpos anti-ErbB3, cada uno de los cuales se une a un epítipo diferente en ErbB3. Preferentemente, el agente terapéutico comprende tres anticuerpos anti-ErbB3, cada uno de los cuales se une a un epítipo diferente en ErbB3.

En otro método descrito, el agente terapéutico comprende un anticuerpo anti-ErbB4. En aún otro método descrito, el agente terapéutico comprende un inhibidor de pan-ErbB o un inhibidor de dimerización de HER. Un ejemplo de un inhibidor de dimerización de HER es el anticuerpo pertuzumab (también conocido como el anticuerpo 2C4), que se describe adicionalmente en Agus, D. B. *et al.* (2005) J. Clin. Oncol. 23: 2534-2543.

En aún otro método descrito, el agente terapéutico comprende uno o más inhibidores de molécula pequeña de una ruta de señalización de ErbB, cuyos ejemplos ilustrativos incluyen gefitinib (Iressa[®]), que está disponible en el mercado en AstraZeneca y Teva y lapatinib (Tykerb[®]), disponible en el mercado en GlaxoSmithKline. Otros ejemplos de inhibidores de molécula pequeña de la ruta de señalización de ErbB incluyen CI- 1033 (PD 183805; Pfizer), erlotinib HCL (OSI-774; Tarceva[®]; OSI Pharma); PKI- 166 (Novartis); PD- 158780; EKB- 569; y Tirfostin AG 1478 (4-(3-cloroanilino)- 6, 7-dimetoxiquinazolina).

En otro método descrito, la red celular comprende una ruta de señalización de c-Met (factor de transición epitelial mesenquimal). En una realización, el uno o más componentes medidos y/o introducidos en a) pueden comprender uno o más ligandos implicados en la ruta de señalización de c-Met. Un ejemplo no limitante de un ligando de este tipo es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Adicionalmente o como alternativa, el uno o más componentes medidos en a) puede comprender uno o más receptores implicados en la ruta de señalización de c-Met. Un ejemplo no limitante de un receptor de este tipo es la proteína tirosina quinasa receptora de c-Met.

En vista de lo anterior, los métodos predictivos descritos en el presente documento permiten la predicción de respuestas celulares, por ejemplo, predicción generada por ordenador de respuestas tumorales, frente a agentes terapéuticos que se dirigen a componentes dentro de la ruta de señalización de c-Met. El agente terapéutico puede comprender, por ejemplo, un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se une a c-Met. Los ejemplos de tales anticuerpos anti-cMet incluyen AV299 (AVEO); AMG102 (Amgen) y 5D5 (OA-5D5; Genentech). Un ejemplo de un agente terapéutico que se dirige a la ruta de señalización de c-Met comprende un anticuerpo monoclonal biespecífico que comprende un anticuerpo anti-ErbB1 enlazado a un anticuerpo anti-cMet. Los ejemplos de tales anticuerpos biespecíficos se describen adicionalmente en las Publicaciones PCT WO 2005/117973 y WO 2006/091209. En otro método descrito, el agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de señalización de c-Met, cuyos ejemplos incluyen ARQ 197 (ArQule) y PHA665752 (Christensen, J. G. *et al.* (2003) Cancer Res. 63: 7345-7355).

En otro método descrito, la red celular comprende una ruta de señalización del receptor de factor de crecimiento de insulina 1 (IGF1R). El uno o más componentes medidos en a) pueden comprender uno o más ligandos implicados en la ruta de señalización de IGF1R. Un ejemplo no limitante de un ligando de este tipo es un factor del crecimiento de insulina 1 (IGF1). Adicionalmente o como alternativa, el uno o más componentes medidos en a) pueden comprender uno o más receptores implicados en la ruta de señalización de IGF1R. Un ejemplo no limitante de un receptor de este tipo es el receptor de IGF1R.

En vista de lo anterior, los métodos predictivos descritos en el presente documento permiten la predicción de respuestas celulares, por ejemplo, predicción generada por ordenador de respuestas tumorales, frente a agentes terapéuticos que se dirigen a componentes dentro de la ruta de señalización de IGF1R. En tales métodos el agente terapéutico puede ser un anticuerpo que se une a IGF1R, cuyos ejemplos incluyen mAb391 (Hailey, J. *et al.* (2002) Mol. Cáncer. Ther. 1: 1349-1353); IMC-A12 (Imclone Systems, Inc.), 19D12 (Schering Plough), H7C10 (Goetsch, L. *et al.* (2005) Int. J. Cáncer 113: 316- 328), CP751, 871 (Pfizer), SCV/FC (ImmunoGen, Inc.) y EM/164 (ImmunoGen, Inc.). El agente terapéutico puede ser un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo anti-IGF1R enlazado a un anticuerpo anti-ErbB3. Tales anticuerpos biespecíficos se describen adicionalmente en las Publicaciones PCT WO 2005/117973 y WO 2006/091209. En otro método descrito, el agente terapéutico es un inhibidor de molécula pequeña de IGF1R (por ejemplo, inhibidor de tirosina quinasa), cuyos ejemplos incluyen NVP-AEW541 (Novartis); NVP-ADW742 (Novartis); NVP- TAE226 (Novartis); BMS- 536, 924 (Bristol- Myers Squibb); BMS- 554, 417 (Bristol- Myers Squibb); ciclolignanos tales como picropodofilina (PPP) (Menu, E. *et al.* (2006) Blood 107: 655- 660); y PQ401 (Gable, K. L. *et al.* (2006) Mol. Cáncer Ther. 5: 1079-1086).

En aún otro método descrito, el agente terapéutico comprende una combinación de agentes terapéuticos, donde la combinación incluye al menos un agente que se dirige a un componente dentro de la ruta de señalización de ErbB, tal como una combinación de agentes que incluye al menos uno de los agentes de la ruta de ErbB descritos anteriormente. Por ejemplo, un agente de combinación puede comprender dos o más agentes que se dirigen a componentes dentro de la ruta de señalización de ErbB. Como alternativa, un agente de combinación puede comprender al menos un agente que se dirige a un componente dentro de la ruta de señalización de ErbB y al menos un agente que se dirige a un componente dentro de otra ruta de señalización, tal como una ruta de señalización de c-Met o IGF1R.

En diversos métodos diferentes, la red celular comprende una combinación de dos o más rutas de señalización, tal como una ruta de señalización de ErbB en combinación con una ruta de señalización de c-Met o una ruta de señalización de ErbB en combinación con una ruta de señalización de IGF1R.

Los métodos predictivos descritos en el presente documento pueden comprender además un procedimiento para determinar, en la muestra de las células, el estado de mutación de uno o más genes en las células. Por ejemplo, el estado de mutación de al menos un gen seleccionado entre KRAS (homólogo del oncogén viral del sarcoma de la rata de Kirsten), PI3K y PTEN se pueden determinar. Adicionalmente o como alternativa, el método puede comprender un sistema informático que recibe, a través de un dispositivo de entrada, entrada que identifica el estado de mutación de uno o más genes en las células, tal como el estado de mutación de al menos un gen seleccionado

entre KRAS, PI3K y PTEN.

En los métodos predictivos, la red celular puede comprender una ruta de señalización de ErbB y a) comprende medir y/o introducir niveles medidos de BTC y AR y el método puede comprender además determinar el estado de mutación o introducir el estado de mutación del gen KRAS. Como otro ejemplo, la red celular comprende una ruta de señalización de ErbB y a) comprende medir y/o introducir los niveles medidos de ErbB 1, ErbB2, ErbB3, HRG, BTC, AR, HB-EGF, EGF, TGF α , EPG y EPR y el método comprende además determinar el estado de mutación o introducir el estado de mutación, del gen KRAS. El NAS calculado en b) puede simular los niveles de una o más proteínas fosforiladas en la ruta de señalización de ErbB, simular los niveles de heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado en la muestra de un tumor de un paciente o simular los niveles de heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado en la muestra de un tumor de un paciente.

Dentro de determinados métodos descritos anteriormente, los valores de NAS o NIS calculados para cada una de una pluralidad de células respondedoras y células no respondedoras frente al agente terapéutico se usan para establecer los valores de NAS o NIS de umbral, lo que indica sensibilidad o no sensibilidad al agente terapéutico. En otro métodos, la respuesta de las células frente al tratamiento se predice comparando el NAS o NIS calculado en (b) con los valores de NAS o NIS de umbral, indicando sensibilidad o no sensibilidad frente al agente terapéutico.

V. Biomarcadores y métodos para predecir respuestas frente a inhibidores de la ruta de ErbB

En el presente documento también se describen biomarcadores directos que predicen la sensibilidad de las células (por ejemplo, células tumorales) frente al tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente de una red celular (por ejemplo, la ruta de señalización de ErbB). Tales biomarcadores se pueden identificar usando los modelos computacionales proporcionados en el presente documento. Los métodos para identificar tales biomarcadores comprenden en general: (a) medir, en una muestra de células, los niveles de uno o más componentes de la red celular; y (b) aplicar un método implementado por ordenador que comprende: (i) el cálculo de niveles de uno o más componentes adicionales de la red celular usando un modelo computacional de la red celular; y (ii) identificar un componente de la red celular cuyo nivel calculado predice la respuesta de la célula frente al tratamiento con un agente terapéutico para de ese modo identificar el componente como un biomarcador para predecir la respuesta de las células frente al tratamiento con el agente terapéutico.

Determinados métodos para identificar un biomarcador para predecir la respuesta de las células frente al tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente dentro de una red celular comprenden:

- a) un sistema informático que recibe, a través de un dispositivo de entrada, entrada que define niveles medidos de uno o más componentes de una red celular, medidos en una muestra de la célula;
- b) el sistema informático que calcula los niveles de uno o más componentes adicionales de la red celular usando un modelo computacional de la red celular; y
- c) el sistema informático que identifica un componente de la red celular cuyo nivel calculado predice la respuesta de las células frente a tratamiento con un agente terapéutico y de ese modo identificar el componente como un biomarcador para predecir una respuesta de las células frente a tratamiento con el agente terapéutico.

Por ejemplo, como se ilustra en el Ejemplo 10, un modelo computacional se puede usar para calcular los niveles de uno o más componentes de una red celular (por ejemplo, la ruta de señalización de ErbB) para obtener uno o más valores de NAS (como una medida de activación de la red celular) y se puede determinar la correlación del NAS con la sensibilidad de las células frente al tratamiento con un agente terapéutico. Aquellos componentes de la red celular para los cuales los niveles calculados separan a las muestras en respondedoras y no respondedoras también se pueden usar posteriormente como biomarcadores directos para predecir la sensibilidad al tratamiento, en particular cuando esos componentes se pueden medir fácilmente mediante medios directos. Es decir, el enfoque de modelo computacional/NAS descrito en el presente documento se puede usar para identificar componente o componentes (calculados) que predicen la sensibilidad de células frente a tratamiento con un agente terapéutico y posteriormente un vez que el componente o los componentes se han identificado, los mismos se pueden medir directamente como biomarcadores directos para predecir la sensibilidad. Por ejemplo, el modelo computacional descrito en el presente documento se usó para calcular los niveles de homo y heterodímeros de la ruta de señalización de ErbB y después esos dímeros que separan a las muestras en respondedoras y no respondedoras se pueden medir directamente como biomarcadores directos para predecir la sensibilidad frente al tratamiento tumoral.

Además, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 8, se ha demostrado actualmente que la medición combinada del nivel de (i) HRG y (ii) al menos un receptor de la familia de ErbB (por ejemplo, ErbB1, ErbB2 y ErbB3) en una muestra de tumor estratifica de forma eficaz a los tumores en respondedores y no respondedores con respecto a la sensibilidad al tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente de una ruta de señalización de ErbB, tal como un anticuerpo anti-ErbB3 (por ejemplo, Ab N° 6). Además, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10, los niveles de heterodímero de ErbB1/ErbB3 o niveles de heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado pueden servir como marcadores directos de sensibilidad frente a tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente de una ruta de señalización de ErbB, tal como un anticuerpo anti-ErbB3

(por ejemplo, Ab N° 6). Además, como se ha descrito adicionalmente en el Ejemplo 12, los niveles de monómero ErbB2, homodímero ErbB2/ErbB2 y heterodímero ErbB2/ErbB3 estratifican de forma eficaz a los tumores en respondedores y no respondedores con respecto a la sensibilidad al tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente de una ruta de señalización de ErbB, tal como un anticuerpo biespecífico anti-ErbB3 x anti-ErbB2 (por ejemplo, H3 x B1D2).

Los métodos para predecir la respuesta de células a tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente de una ruta de señalización de ErbB pueden comprender:

- (a) medir, en una muestra de células, los niveles de (i) HRG y (ii) al menos un receptor seleccionado entre ErbB1, ErbB2 y ErbB3; y
- (b) predecir, usando un ordenador, la respuesta de las células frente a tratamiento con el agente terapéutico en base a los niveles medidos en (a), donde niveles elevados de HRG y el al menos un receptor, con relación a un control, predicen sensibilidad a tratamiento con el agente terapéutico.

En determinadas situaciones se miden los niveles de HRG y ErbB1. En otros casos, se miden los niveles de HRG y ErbB2 o se miden los niveles de HRG y ErbB3. En otras situaciones, se miden los niveles de HRG y al menos dos receptores seleccionados entre ErbB1, ErbB2 y ErbB3 o se miden los niveles de HRG, ErbB1, ErbB2 y ErbB3. En determinadas situaciones, la predicción se puede realizar de forma informática, usando un método que comprende:

- (i) un sistema informático que recibe, a través de un dispositivo de entrada, entrada que identifica los niveles medidos de (i) HRG y (ii) al menos un receptor seleccionado entre ErbB1, ErbB2 y ErbB3, niveles que se han medido en una muestra de las células; y
- (ii) el sistema informático que genera y a partir de entonces produce en un dispositivo de salida, una respuesta predicha de las células frente a tratamiento con el agente terapéutico en base a los niveles medidos, donde niveles elevados de HRG y el al menos un receptor, con relación a un control, predicen sensibilidad al tratamiento con el agente terapéutico.

Los agentes terapéuticos preferidos para los cuales se predice la sensibilidad incluyen anticuerpos anti-ErbB3, más preferentemente Ab N° 6 (que tienen secuencias de V_H y V_L como se muestra en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente) o un anticuerpo anti-ErbB3 que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 6, que se muestran en SEC ID N°: 7-9 (CDR1, 2, 3 de V_H) y 10-12 (CDR1, 2, 3 de V_L), respectivamente.

Otros métodos para predecir la respuesta de células frente a tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente de una ruta de señalización de ErbB comprenden:

- (a) medir, en una muestra de las células, los niveles de uno o más de heterodímero ErbB1/ErbB3, monómeros ErbB2, homodímero ErbB2, heterodímero ErbB2/ErbB3, heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado y heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado y
- (b) predecir, usando un ordenador, la respuesta de las células frente a tratamiento con el agente terapéutico en base a los niveles medidos en (a), donde una diferencia en el nivel de heterodímero ErbB1/ErbB3, monómeros ErbB2, homodímero ErbB2, heterodímero ErbB2/ErbB3, heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado o heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado, con relación a un control, predice la sensibilidad al tratamiento con el agente terapéutico.

La predicción se puede realizar informáticamente, usando un método que comprende:

- (i) un sistema informático que recibe, a través de un dispositivo de entrada, entrada que identifica los niveles medidos de uno o más de heterodímero ErbB1/ErbB3, monómero ErbB2, homodímero ErbB2, heterodímero ErbB2/ErbB3, heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado y heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado, niveles que se han medido en una muestra de las células; y
- (ii) el sistema informático que genera y a partir de entonces produce en un dispositivo de salida, una respuesta predicha de las células frente a tratamiento con el agente terapéutico en base a los niveles medidos, donde una diferencia en el nivel de heterodímero ErbB1/ErbB3, monómeros ErbB2, homodímero ErbB2/ErbB2, heterodímero ErbB2/ErbB3, heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado o heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado, con relación a un control, predice la sensibilidad frente al tratamiento con el agente terapéutico.

Dentro de determinadas realizaciones de los métodos anteriores, los niveles medidos se introducen en un algoritmo de clasificación estadística y la respuesta de las células frente al tratamiento se predice en base al resultado del algoritmo. En tales métodos adicionales, se calcula un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) en base a los niveles medidos usando un modelo computacional de una red celular de ErbB; preferentemente, la respuesta de las células frente al tratamiento con el agente terapéutico se predice en base al valor de NAS o NIS calculado.

Dentro de determinadas realizaciones, los niveles medidos son niveles de monómero ErbB2, homodímero ErbB2:ErbB2 y/o heterodímero ErbB2:ErbB3 y el agente terapéutico es un anticuerpo biespecífico que comprende

un anticuerpo anti-ErbB3 enlazado a un anticuerpo anti-ErbB2, como se ha descrito anteriormente.

Las células preferidas para su uso en los métodos anteriores son células tumorales, incluyendo aquellas mencionadas anteriormente. Las muestras incluyen tejido de tumor, aspirado con aguja fina, aspirado de pezón, sangre completa, suero, plasma, linfa, saliva y orina o células tumorales eliminadas o en circulación aisladas de las mismas.

Será evidente que, como se ha indicado anteriormente, los niveles medidos son niveles de proteína (por ejemplo, monómeros, homodímeros o heterodímeros) o niveles de ARNm y generalmente se pueden determinar como se ha descrito anteriormente.

Cualquiera de los métodos anteriores puede, aunque no es necesario, comprender adicionalmente la selección de un régimen de tratamiento (por ejemplo, para el agente terapéutico) en base a la respuesta predicha de las células al tratamiento; y/o puede comprender además preparar el agente terapéutico para su uso en base a la respuesta predicha.

En algunas situaciones, la diferencia en el nivel, con relación a un control, es un nivel elevado. Los métodos anteriores pueden, aunque no es necesario, comprender adicionalmente el tratar las células o un sujeto (paciente) a partir del cual se han obtenido las células, con un agente terapéutico, en base a la sensibilidad predicha de las células frente al agente terapéutico.

Para los métodos en los cuales se miden los niveles de heterodímero ErbB1/ErbB3 y/o heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado, preferentemente el agente terapéutico para el cual se predice la sensibilidad es un anticuerpo anti-ErbB3, más preferentemente Ab N° 6 (que tiene las secuencias de V_H y V_L como se muestran en la SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente) o un anticuerpo anti-ErbB3 que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L de Ab N° 6, que se exponen en SEC ID N°: 7-9 (CDR1, 2, 3 de V_H) y 10-12 (CDR1, 2, 3 de V_L), respectivamente.

Para los métodos en los cuales se miden los niveles de monómero ErbB2, homodímero ErbB2/ErbB2 y/o heterodímero ErbB2/ErbB3, el agente terapéutico para el cual se predice la sensibilidad es preferentemente un anticuerpo biespecífico anti-ErbB3 x anti-ErbB2, más preferentemente anticuerpo biespecífico H3 x B1D2 (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 41) o un anticuerpo biespecífico que comprende un anticuerpo anti-ErbB3 que comprende las CDR de H3 (SEC ID N°: 42-44 y 45-47) enlazados a un anticuerpo anti-ErbB2 que comprende las CDR de B1D2 (SEC ID N°: 48-50 y 51-53).

Los niveles de homo o heterodímeros receptores u homo o heterodímeros receptores fosforilados se pueden medir en las muestras de las células usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales homo o heterodímeros se pueden medir usando métodos de detección de dimerización tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7.105.308, Patente de Estados Unidos N° 7.255.999, Publicación de Estados Unidos N° 20040229380 y Publicación de Estados Unidos N° 20080187948. Estos métodos emplean pares de sondas (por ejemplo, anticuerpos), una es una sonda etiquetada y una es una sonda de escisión, donde cada sonda se une específicamente a un componente del dímero. La unión de las dos sondas al dímero da como resultado la escisión y liberación de la etiqueta molecular del complejo dimérico, proporcionando una medición de formación del complejo dimérico. Tales ensayos también se denominan en el presente documento métodos basados en proximidad, un ejemplo disponible en el mercado de los cuales es el sistema VeraTag™ (Monogram Biosciences). Como alternativa, se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para cuantificar niveles de dímeros, incluyendo pero sin limitación coimmunoprecipitación de los componentes con el dímero y uso de otros métodos basados en proximidad tales como métodos basados en transparencia de energía de resonancia de Forster y complementación de fluorescencia biomolecular (BiFC) (descrito adicionalmente en, por ejemplo, Tao, R. H. y Maruyama, I. N. (2008) J. Cell Sci. 121: 3207-3217).

En una realización de los métodos de biomarcador directo anteriores, los niveles medidos en a) se introducen en un algoritmo de clasificación estadística almacenado por un sistema informático y la respuesta de la célula frente al tratamiento se predice en base al resultado del algoritmo basado en cálculos y transformación de los datos en el sistema informático con el uso del algoritmo y niveles medidos. En otra realización, se calcula un Estado de Activación de Red (NAS) o un Estado de Inhibición de Red (NIS) en base a los niveles medidos en a) usando un modelo computacional de una red celular de ErbB. La respuesta de las células al tratamiento con el agente terapéutico se puede predecir en base al menos en parte al valor de NAS o NIS calculado.

En diversas realizaciones, el agente terapéutico comprende cualquier combinación de uno o más de un anticuerpo anti-ErbB3, un anticuerpo anti-ErbB1, un anticuerpo anti-ErbB2, un anticuerpo anti-ErbB4, un inhibidor pan-ErbB, un inhibidor de dimerización de HER y un inhibidor de molécula pequeña de una ruta de señalización de ErbB, cada uno de los cuales se describe e ilustra anteriormente.

VI. Usos de los métodos en tratamiento

Los métodos descritos se pueden usar para predecir la eficacia de tratamiento para una amplia diversidad de

trastornos en los cuales están disponibles agentes terapéuticos que se dirigen a uno o más componentes de una red celular implicada en el trastorno. Aún más, los métodos se pueden usar en la selección de régimen de tratamiento para un sujeto que sufre del trastorno, donde los métodos pueden comprender además tratar al sujeto de acuerdo con el régimen de tratamiento seleccionado, que puede comprender administrar uno o más agentes terapéuticos al sujeto. Los ejemplos no limitantes de trastorno incluyen cáncer, trastornos autoinmunes y trastornos inflamatorios.

Los métodos son particularmente útiles para predecir, por ejemplo, predecir computacionalmente, la respuesta de un tumor frente a tratamiento con un agente terapéutico, es decir, predecir la sensibilidad de un paciente que porta el tumor al tratamiento con un agente terapéutico. Los métodos predictivos se pueden usar con cualquier tumor que sea dependiente de la ruta de señalización que se modela en el método. Por ejemplo, en una realización, el método se usa con tumores que son dependientes de la ruta de señalización de ErbB (por ejemplo, la ruta de señalización de ErbB3). El método descrito también se puede usar con tumores que son dependientes de las rutas de señalización de c-Met o IGF1R. En una realización preferida, el tumor es un tumor de cáncer de colon. En otra realización preferida, el tumor es un tumor de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En otra realización, el tumor es un tumor sólido. En otra realización, el tumor es un tumor no sólido, tal como un sarcoma de células claras. En diversas realizaciones diferentes, el tumor puede ser, por ejemplo, un tumor de un tejido seleccionado entre pulmón, colon, recto, vesícula biliar, cerebro, médula espinal, mama, riñón, páncreas, estómago, hígado, hueso, piel, bazo, ovario, testículo, próstata, cabeza y cuello, tiroides y músculo. En aún otras realizaciones, el tumor es un tumor gástrico, un tumor de estómago o un tumor oral/de faringe.

Para conducir el método predictivo, una muestra de células, por ejemplo, células de tumor, se obtiene a partir del paciente. Por ejemplo, una muestra preferida del tumor es una muestra de tejido tumoral. Una muestra de tejido tumoral se puede obtener mediante métodos convencionales, tales como biopsia del tumor o resección quirúrgica del tumor. Se puede usar una muestra congelada fresca de tejido tumoral o, como alternativa, una muestra de tejido incrustada en parafina y fijada en formalina (FFPE) también es adecuada para su uso. Otros tipos de muestras del tumor también pueden ser susceptibles de uso en los métodos, donde la muestra contiene células del tumor y/o componentes celulares secretados por el tumor. Los ejemplos no limitantes de otros tipos de muestras del tumor incluyen aspirado con aguja fina, aspirado de pezón, sangre completa, suero, plasma, linfa, saliva y orina o células tumorales eliminadas o en circulación aisladas a partir de las mismas.

En una realización preferida, la invención proporciona un método para predecir la respuesta de un paciente de cáncer al tratamiento con un agente terapéutico, donde el método se puede llevar a cabo fácilmente y rápidamente mediante un laboratorio de diagnóstico para proporcionar información rápida con respecto a la probabilidad de un tumor de un paciente de responder a un tratamiento terapéutico particular. En este método predictivo, una muestra de tumor, tal como una muestra congelada fresca o una muestra de tejido archivada FFPE se obtiene a partir del paciente y los niveles de receptor/ligando del tumor se miden a través de inmunohistoquímica semicuantitativa (IHC). La elección del receptor o receptores y ligando o ligandos para medirse se basa en la red celular a la cual se dirige el agente terapéutico (por ejemplo, para la ruta de ErbB, se pueden medir los siguientes ligandos/receptores: HRG, BTC, ErbB1, ErbB2 y ErbB3). Las mediciones de IHC semicuantitativa posteriormente se convierten en concentraciones usando un portaobjetos de control, que contiene tapones celulares o xenoinjertos con niveles de expresión de receptor y ligando conocidos para compararse con la muestra del paciente. En determinadas situaciones, el estado de mutación de uno o más genes de interés (por ejemplo, PI3K, PTEN) se puede determinar en la muestra usando métodos de determinación de genotipo convencionales. A continuación, el conjunto de datos (concentraciones de ligando y receptor, estado de mutación de genes si se determina) se introduce en un modelo computacional de la red celular de interés y se calcula un estado de activación de red (NAS). La predicción de sensibilidad frente al agente terapéutico puede entonces realizarse en base a la comparación del valor de NAS calculado con los valores de NAS de umbral para respondedores y no respondedores. El uso de una aplicación basada en web para introducir los datos de concentración de proteína y mutación en el modelo computacional, seguido por el resultado de NAS y la respuesta predicha, permite que un laboratorio de diagnóstico obtenga conocimiento casi instantáneo de la probabilidad del tumor de responder a tratamiento con el agente terapéutico.

Para cualquiera de los métodos predictivos descritos en el presente documento, después de que las respuestas de las células (por ejemplo, células tumorales) al tratamiento con un agente terapéutico se ha predicho usando el método, el método puede comprender además seleccionar un régimen de tratamiento para el sujeto en base a la respuesta predicha de las células (por ejemplo, células tumorales) al tratamiento. Por ejemplo, los métodos pueden comprender además que el sistema informático presente y recomiende de forma manual o automática y/o seleccione un régimen de tratamiento para el sujeto en base a la respuesta o respuestas predichas de forma informática de las células al tratamiento. Aún más, una vez que se ha recomendado o seleccionado un régimen de tratamiento en base a la sensibilidad predicha de las células, los métodos pueden comprender además tratar al sujeto de acuerdo con el régimen de tratamiento recomendado o seleccionado, lo cual puede comprender administrar uno o más agentes terapéuticos al sujeto.

En el presente documento también se describen kits para predecir la respuesta de células (por ejemplo, células tumorales) frente al tratamiento con un agente terapéutico que se dirige a un componente dentro de una red celular. Un kit de este tipo comprende: a) un ensayo o ensayos para detectar los niveles de uno o más componentes de la red celular; b) instrucciones para calcular un Estado de Activación de Red (NAS) o Estado de Inhibición de Red

(NIS) de las células usando un modelo computacional de la red celular; y c) instrucciones para el uso del kit para predecir la respuesta de las células al tratamiento con el agente terapéutico. El kit puede comprender además instrucciones para aplicar un algoritmo de clasificación estadística para el cálculo del NAS o el NIS.

- 5 La red celular puede ser, por ejemplo, una ruta de señalización de ErbB, una ruta de señalización de c-Met o una ruta de señalización de IGF1R. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, cualquiera de los agentes terapéuticos descritos anteriormente que se dirigen a componentes dentro de cualquiera de estas rutas.

- 10 En una realización, los medios para detectar los niveles de uno o más componentes de la red celular es uno o más reactivos que permiten la detección de niveles de proteína del componente o componentes, tal como uno o más reactivos de anticuerpo. En otra realización, los medios para detectar los niveles de uno o más componentes de la red celular es uno o más reactivos que permiten la detección de niveles de ARNm del componente o componentes, tal como uno o más reactivos de ácido nucleico (por ejemplo, sondas de ácido nucleico, cebadores de PCR y similares). Tales reactivos para detección de niveles de proteína o ARNm de componentes celulares se conocen bien por los expertos. Tales medios para detectar los niveles también pueden incluir dispositivos informáticos configurados para medir los niveles de proteína.

- 20 Los ensayos adecuados para la detección de los niveles de proteína de los componentes celulares incluyen los descritos en este documento, tales como la clasificación de células activadas por fluorescencia cuantitativa (qFACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA, Luminex), inmunohistoquímica (IHC), inmunohistoquímica cuantitativa (qIHC), espectrometría de masas y ensayo de Western (inmunotransferencia). Los ensayos adecuados para la detección de niveles de ARNm de los componentes celulares incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) y análisis de transferencia de Northern. Los medios para detectar los niveles de uno o más componentes de la red celular también pueden incluir, por ejemplo, tampones u otros reactivos para su uso en un ensayo para la evaluación de los niveles del componente o componentes. El kit puede incluir instrucciones, (por ejemplo, instrucciones impresas, tales como una etiqueta o prospecto) para realizar el ensayo o ensayos para la detección de los niveles de uno o más componentes de la red celular.

- 30 Cuando la red celular es una ruta de señalización de ErbB, el kit puede incluir medios para detectar los niveles de uno o más componentes (por ejemplo, uno o más de receptores, homodímeros receptores, heterodímeros receptores y ligandos receptores) de una ruta de señalización de ErbB seleccionados entre ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, HRG (incluyendo HRG- β 1), BTC, EGF, HB-EGF, TGF α , AR, EPG y EPR, preferentemente medios para detectar los niveles de al menos un receptor de la ruta de señalización de ErbB (por ejemplo, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4) y al menos un ligando de ruta de señalización de ErbB (por ejemplo, HRG, BTC, EGF, HB-EGF, TGF α , AR, EPG y EPR). Por ejemplo, el kit puede incluir medios para detectar los niveles de ErbB1, ErbB2, ErbB3, HRG y BTC, medios para detectar los niveles de ErbB1 y HRG, medios para detectar ErbB1, ErbB2 y ErbB3 o medios para detectar monómero ErbB2, homodímero ErbB2, heterodímero ErbB2/ErbB3 o heterodímero ErbB1/ErbB3.

- 40 Los medios para calcular el Estado de Activación de Red (NAS) o un estado de Inhibición de Red (NIS) para las células usando un modelo computacional de la red celular puede ser, por ejemplo, un producto de programa informático que contiene instrucciones ejecutables que cuando se ejecutan provocan que un procesador lleve a cabo operaciones para el cálculo de un NAS o NIS de las células. Como alternativa, los medios para calcular un NAS o NIS pueden ser, por ejemplo, un componente que permite que el usuario del kit se conecte con un servicio basado en Internet que desarrolla un programa informático que puede calcular un NAS o NIS para las células tras la entrada mediante el usuario de información acerca de los niveles de uno o más componentes de la red celular en las células. Un componente de este tipo puede incluir, por ejemplo, una interfaz, una página web y/o una contraseña para permitir el acceso al servicio basado en Internet e instrucciones, por ejemplo, instrucciones impresas, para uso del servicio. Los sistemas informáticos y software establecidos en la técnica y descritos adicionalmente en el presente documento, se pueden adaptar para su uso en los kits de la invención. Los dispositivos informáticos y los componentes informáticos a los que se hace referencia en la Figura 16 también pueden incluir medios para calcular el NAS o NIS, tales como procesadores informáticos, dispositivos de medición y entrada, dispositivos de salida y así sucesivamente.

- 55 Las instrucciones de uso del kit para predecir la respuesta de las células a tratamiento con el agente terapéutico pueden incluir instrucciones informáticas e interfaces informática, así como también publicaciones y manuales impresos. En algunos casos, el kit se empaca en conjunto. En otras realizaciones, los diversos componentes del kit se mantienen en emplazamientos dispares. Por ejemplo, algunos de los componentes se pueden mantener, almacenar o alojar en uno o más sistemas informáticos remotos y están únicamente disponibles a través de una conexión en red.

- 60 Preferentemente, los kits se diseñan para su uso con un sujeto humano, tal como un paciente humano que tiene un tumor. En tales casos, las células son típicamente células obtenidas a partir del paciente mediante biopsia o resección del tumor.

- 65 VII. Métodos terapéuticos y kits

En el presente documento se describen métodos para tratar a un paciente que tiene un tumor maligno. En general, tales métodos comprenden: obtener una muestra (por ejemplo una muestra de biopsia o resección) de un tumor del paciente; determinar el nivel de uno o más biomarcadores en la muestra y administrar un agente terapéutico al paciente si los niveles del biomarcador o biomarcadores en la muestra coinciden con un perfil predeterminado, por ejemplo, el nivel de un biomarcador es mayor que un nivel mínimo. Tales métodos se aplican a cualquier tumor sólido. Las muestras de tumor adecuadas son como se han descrito anteriormente generalmente. En determinados métodos un biomarcador es una proteína receptora ErbB.

Determinados métodos comprenden: obtener una muestra del tumor, ensayar el nivel de pErbB3 en la muestra y posteriormente administrar al menos un agente terapéutico antineoplásico al paciente, donde, si el nivel de pErbB3 determinado en la muestra no es menor que un nivel mínimo que es el 25%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% (preferentemente el 50%) del nivel de pErbB3 ensayado en un cultivo de células ACHN (células de cáncer renal, ATCC N° CRL-1611) a continuación de cultivo durante aproximadamente 20-24 horas en medio sin suero, entonces el al menos un agente terapéutico antineoplásico administrado posteriormente al paciente comprende un anticuerpo anti-ErbB3 y si el nivel de pErbB3 determinado en la muestra es menor que el nivel mínimo, entonces el al menos un agente terapéutico antineoplásico administrado posteriormente al paciente no comprende un anticuerpo anti-ErbB3. Los cultivos preferidos de células ACHN son aquellos que se han pasado no más de 9 veces, por ejemplo, células ACHN de 8 pases. En aspectos adicionales de tales realizaciones, el biomarcador es pErbB3, el agente terapéutico es un anticuerpo anti-ErbB3 y el nivel mínimo es el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100% del nivel observado en células tumorales a partir de un modelo de tumor de xenoinjerto de ACHN. En aspectos adicionales, el nivel mínimo es 0,064 pg/μg de proteína total, 0,08 pg/μg de proteína total, 0,096 pg/μg de proteína total, 0,122 pg/μg de proteína total, 0,128 pg/μg de proteína total, 0,144 pg/μg de proteína total o 0,16 pg/μg de proteína total.

En las realizaciones anteriores, el nivel de pErbB3 en la muestra puede, en algunos aspectos, determinarse mediante: a) medición de los niveles de al menos dos componentes de la ruta de señalización de ErbB3 en la muestra, b) cálculo de un Estado de Activación de Red (NAS) que estimula el nivel de pErbB3 en la muestra usando el nivel o niveles medidos en (a) introducidos en un modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB3; y (c) la determinación a partir de los mismos del nivel de pErbB3 en la muestra. En determinadas realizaciones, los niveles de al menos tres, cuatro, cinco o seis componentes de la ruta de señalización de ErbB3 se detectan en (a). Los componentes adecuados de la ruta de señalización de ErbB3 incluyen, por ejemplo, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 (y homo y heterodímeros de las proteínas ErbB), HRG (por ejemplo, HRG-β1), BTC, EGF, HB-EGF, TGFα, AR, EPG y EPR. Estos componentes se pueden ensayar como la proteína (por ejemplo, un monómero, un homodímero o un heterodímero) o cuando sea aplicable (por ejemplo, cuando el nivel total de la proteína se mide independientemente del estado de fosforilación, pero no cuando se mide un nivel de fosfoproteína, por ejemplo, de un monómero, homodímero o heterodímero), como ARNm que codifica la proteína. Los ensayos apropiados se conocen bien en la técnica e incluyen los que se han descrito en el presente documento.

En aspectos adicionales, el método para determinar el nivel de pErbB3 comprende adicionalmente aplicar un algoritmo de clasificación estadística para generar el modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB3 usado en el cálculo de NAS. En realizaciones adicionales, el NAS calculado simula los niveles de un heterodímero ErbB1/ErbB3 fosforilado y/o un heterodímero ErbB2/ErbB3 fosforilado en la muestra.

Los anticuerpos anti-ErbB3 para su uso dentro de la presente invención incluyen, pero sin limitación los anticuerpos anti-ErbB3 desvelados en la Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2008/002119, publicada como Publicación Internacional N° WO 2008/100624, que se incorpora en el presente documento por referencia. Un anticuerpo particularmente preferido en la misma desvelado se conoce actualmente como MM-121, que actualmente está siendo sometido a ensayos clínicos de Fase I. Los anticuerpos anti-ErbB3 preferidos también incluyen los anticuerpo anti-ErbB3 descritos anteriormente. Otro anticuerpo anti-ErbB3 que se puede usar en los métodos desvelados en el presente documento es U3-1287 (AMG888) (U3 Pharma AG and Amgen), que actualmente se está sometiendo a ensayos clínicos de Fase I.

Los tumores susceptibles de tratamiento como se describe en el presente documento son generalmente como se ha descrito anteriormente. Los tumores ilustrativos son de un órgano seleccionado entre colon, pulmón, recto, vesícula biliar, cerebro, médula espinal, mama, riñón, páncreas, estómago, hígado, hueso, piel, bazo, ovario, testículo, próstata y músculo. En algunos aspectos, se prefieren los tumores positivos ErbB3 o tumores positivos ErbB2 y ErbB3 (por ejemplo, tumores mamarios y tumores de cáncer de pulmón de células no pequeñas).

El agente terapéutico antineoplásico se puede administrar al paciente en cualquier forma adecuada. Típicamente, el agente terapéutico se proporciona en forma de una composición farmacéutica, que comprende el agente terapéutico en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable. Si se desea, también se pueden incluir otros ingredientes activos o inactivos dentro de la composición farmacéutica.

Como se usa en el presente documento, el término "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal (por ejemplo, la FDA de Estados Unidos o la EMEA) o enumerados en la Farmacopea de los Estados Unidos u otras farmacopeas reconocidas de forma general para uso en animales y más

particularmente en seres humanos. El término “vehículo” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se formula y se administra el agente terapéutico antineoplásico. Los vehículos fisiológicamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como soluciones acuosas, que son vehículos preferidos para administración intravenosa u otra administración parenteral. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas son ejemplos de vehículos acuosos para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, agentes de tamponamiento de pH o conservantes.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier manera o administración apropiada, incluyendo, por ejemplo, administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como mediante un medio transdérmico, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Los ejemplos de modos de administración farmacéuticos adecuados y vehículos se describen en “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, A.R. Gennaro, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (21ª ed., 2005).

Comúnmente, las composiciones farmacéuticas usadas en los métodos proporcionados en el presente documento se administran por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea). Para administración parenteral, el agente terapéutico antineoplásico se puede suspender o disolver en el vehículo. Generalmente se prefiere un vehículo acuoso estéril, tal como agua, agua tamponada, solución salina o solución salina tamponada con fosfato. Adicionalmente, se pueden emplear aceites estériles fijos como un disolvente o medio de suspensión. Para este fin se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, ácidos grasos tales como ácido oleico se pueden usar en la preparación de composiciones inyectables. Las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables también se pueden incluir para aproximarse a condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y tamponamiento de pH, agentes de ajuste de tonicidad, agentes de dispersión, agentes de suspensión, agentes humectantes, detergentes, conservantes, anestésicos locales y agentes de tamponamiento.

En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa a un paciente (por ejemplo, un ser humano). Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante. Los ingredientes se pueden suministrar por separado o mezclados en conjunto en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla. Cuando la composición se tiene que administrar mediante infusión, la misma se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico o estéril. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de forma que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales o las mismas se pueden esterilizar por filtración. Las soluciones acuosas estériles se pueden envasar para su uso como tales o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de una composición farmacéutica acuosa típicamente estará entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8 y más preferentemente entre 7 y 8, tal como 7 a 7,5.

El agente terapéutico generalmente está presente dentro de una composición farmacéutica a una concentración de forma que la administración de una dosis única a un paciente suministre una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado un beneficio para el paciente discernible, tal como un retardo o cese del crecimiento tumoral o preferentemente una reducción del tamaño tumoral. Las cantidades terapéuticamente eficaces están influidas por una diversidad de factores, incluyendo la actividad del agente terapéutico antineoplásico empleado; la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el momento y la vía de administración; la velocidad de excreción; cualquier tratamiento simultáneo, tal como una combinación de fármaco; y el tipo y gravedad del daño de tejido en el paciente que está recibiendo el tratamiento. Las dosis óptimas se pueden establecer usando ensayos de rutina y procedimientos que se conocen bien en la técnica. En general, se prefieren las composiciones que proporcionan niveles de dosis que varían desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día, por semana o una vez cada 2 semanas. Los ejemplos no limitantes de intervalos y regímenes de dosificación adecuados incluyen 2-50 mg/kg (peso corporal del sujeto) administrados una vez a la semana o dos veces a la semana o una vez cada tres días, una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas y 1-100 mg/kg administrado una vez a la semana o dos veces a la semana o una vez cada tres días o una vez cada dos semanas. En diversas realizaciones, un agente terapéutico se administra a una dosis de 3,2 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg o 40 mg/kg con una frecuencia de una vez a la semana o dos veces a la semana o una vez cada tres días o una vez cada dos semanas o una vez cada tres semanas. Los intervalos de dosificación adicionales incluyen: 1-1000 mg/kg, 1-500 mg/kg, 1-400 mg/kg, 1-300 mg/kg y 1-200 mg/kg. Los programas de dosificación adecuados incluyen una vez cada tres días, una vez cada cinco días, una vez cada siete días (es decir, una vez a la semana), una vez cada 10 días, una vez cada 14 días (es decir, una vez cada dos semanas), una vez cada 21 días (es decir, una vez cada tres semanas), una vez cada 28 días (es decir, una vez cada cuatro semanas) y una vez al mes.

Preferentemente, el agente terapéutico (por ejemplo, anticuerpo anti ErbB3) se administra a un paciente de acuerdo con las direcciones en la información de prescripción proporcionada por el fabricante o distribuidor del agente terapéutico.

- 5 También se describen kits para el uso en el tratamiento de pacientes que tienen un tumor maligno. Tales kits determinados comprenden típicamente: a) al menos un ensayo para detectar el nivel de al menos un componente de la ruta de señalización de ErbB3 en una muestra; y b) instrucciones para calcular un Estado de Activación de Red (NAS) que simula el nivel de pErbB3 usando un modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB3 en el que se han introducido datos obtenidos a partir de al menos un ensayo. En determinadas realizaciones, tales kits
10 comprenden además instrucciones para aplicar un algoritmo de clasificación estadística. En determinadas realizaciones, el kit también comprende un anticuerpo anti-ErbB3. El ensayo típicamente comprende uno o más reactivos que permiten la detección de al menos un componente de proteína o al menos un componente de ARNm. En determinadas realizaciones, las instrucciones para calcular un NAS comprenden dirigir el uso de un producto de programa informático que contiene instrucciones ejecutables que cuando se ejecutan por un ordenador provocan que un procesador lleve a cabo operaciones para el cálculo de un NAS; en tales realizaciones, el usuario se puede instruir para desarrollar el programa informático en un ordenador local o el usuario se puede instruir para conectarse con un servicio basado en Internet que desarrolla el programa informático de forma remota.

Dentro de realizaciones adicionales, se proporcionan kits que comprenden anticuerpos anti-ErbB3 e instrucciones (por ejemplo, en forma de etiqueta, por ejemplo, un prospecto) que indican que el anticuerpo anti-ErbB3 se tiene que administrar al paciente si el nivel de pErbB3 en una biopsia tumoral del paciente excede un valor mínimo especificado y que el anticuerpo anti-ErbB3 no se tiene que administrar al paciente si el nivel de pErbB3 no excede el valor mínimo especificado. Por ejemplo, tales instrucciones pueden indicar que el anticuerpo anti-ErbB3 se tiene que administrar a un paciente que tiene un tumor maligno si el nivel de ErbB3 fosforilado determinado en la muestra
25 no es menor del 50% de un nivel de ErbB3 fosforilado medido en un cultivo de células de cáncer renal ACHN (ATCC N° CRL-1611) después de cultivo durante aproximadamente 20-24 horas en medio sin suero; y que un anticuerpo anti-ErbB3 no se tiene que administrar a un paciente que tiene un tumor maligno si el nivel de ErbB3 fosforilado determinado en la muestra es menor del 50% del nivel de ErbB3 fosforilado medido en el cultivo de células de cáncer renal ACHN.

30 VIII. Realizaciones de Cálculo

Como se ha mencionado anteriormente y como debe ser fácilmente evidente a partir de la divulgación proporcionada en este documento, muchos de los métodos descritos utilizan uno o más sistemas informáticos para realizar los
35 diversos procesos descritos anteriormente, incluyendo, pero sin limitación, predecir respuestas de pacientes, generar tratamientos recomendados, identificar biomarcadores, cálculo de valores de NAS o NIS, obtención de modelos computacionales de rutas de señalización y así sucesivamente.

Las Figuras 15A y 15B ilustran diagramas de flujo de algunos de los procesos que se pueden realizar por uno o más
40 sistemas informáticos durante la implementación de determinadas realizaciones de la invención. Como se muestra, por ejemplo, sistemas informáticos se pueden utilizar para medir y/o recibir entrada de niveles medidos de componentes en una red celular de un tumor así como el estado de mutación de los genes tumorales. Los sistemas informáticos también se pueden usar para obtener modelos computacionales, que se pueden obtener, por ejemplo recibiendo, descargando, construyendo, modificando, entrenando y/o accediendo a modelos computacionales a
45 partir de fuentes locales y remotas.

Una vez que se ha obtenido un modelo computacional, uno o más sistemas informáticos calculan el NAS o el NIS de las células, tal como, por ejemplo, simulando los niveles pertinentes de proteínas, homodímeros y/o heterodímeros fosforilados en las células. El modelo computacional también se puede usar mediante el sistema informático para
50 identificar biomarcadores predictivos a través de la identificación de componentes pertinentes adicionales en la red celular en base a ajustes de usuario recibidos en el sistema informático.

El sistema informático también se puede usar para identificar algoritmos de clasificación estadística que se pueden recibir, construir y/o modificar mediante el sistema informático como parte del proceso de identificación en el que se
55 pueden usar en diversas combinaciones con los datos de NAS o NIS, otros datos de biomarcador y datos de paciente, para generar respuestas de pacientes predichas frente a los tratamientos y/o para generar y seleccionar tratamientos recomendados.

Aunque los elementos ilustrados en los diagramas de flujo de las Figuras 15A y 15B infieren una secuencia u
60 ordenamiento sugerido para llevar a cabo los procesos informáticos de la invención, se apreciará que los procesos ilustrados en las Figuras 15A y 15B también se pueden llevar a cabo en secuencias que tienen orden diferente. Por ejemplo, un tratamiento recomendado se puede identificar antes de generar el modelo computacional o calcular el NAS o NIS y que se puede usar en la construcción del modelo computacional. De forma similar, la medición de los niveles de proteína se puede producir antes de o posteriormente a la generación del modelo computacional.

65

También se apreciará que se pueden llevar a cabo procesos adicionales, tales como procesos para obtener información del paciente (por ejemplo, edad, género, historia clínica) y para rastrear resultados reales de tratamientos recomendados, así como también otros procesos.

- 5 También se apreciará que los sistemas informáticos pueden incluir uno o más sistemas informáticos diferentes, de diferentes tipos, así como en diferentes emplazamientos.

La Figura 16 ilustra un ejemplo de un sistema informático que se puede usar, por ejemplo, para llevar a cabo al menos algunos de los procesos ilustrados en las Figuras 15a y 15B, así como aquellos descritos a lo largo de este documento. Como se ilustra, el sistema informático incluye diversos dispositivos de entrada, dispositivos de salida, módulos informáticos, componentes de procesamiento y medios de almacenamiento. Los dispositivos de entrada pueden incluir teclados, dispositivos de ratón, touch pads, pantallas táctiles, micrófonos, así como cualquier otro dispositivo de entrada. Los dispositivos de salida pueden incluir altavoces, pantallas de visualización, dispositivos de impresión, interruptores, así como también otros dispositivos de salida. Los módulos informáticos incluyen los diversos módulos necesarios para llevar a cabo la funcionalidad descrita en este documento, incluyendo módulos para recibir y construir modelos computacionales, módulos para calcular el NAS o NIS, módulos para identificar biomarcadores predictivos, módulos para obtener, reconocer y almacenar niveles medidos de componentes y para identificar y determinar estado de gen de mutación, módulos para identificar y aplicar algoritmos de clasificación estadística, módulos para generar respuestas predichas a los tratamientos, módulos para generar y seleccionar tratamientos recomendados, módulos de comunicaciones para conectarse con usuarios y uno o más dispositivos diferentes, así como también módulos para llevar a cabo los diversos procesos diferentes descritos en el presente documento.

El sistema informático también incluye uno o más procesadores y otros componentes de procesamiento necesarios para ejecutar los módulos anteriores, así como medios de almacenamiento para almacenar los módulos anteriores, así como también las diversas estructuras de datos, modelos computacionales y otros datos descritos en el presente documento. Aunque los medios de almacenamiento se ilustran como que son locales al sistema informático, se apreciará que los medios de almacenamiento también pueden estar ubicados remotamente del sistema informático o únicamente parcialmente locales en el sistema informático. Por ejemplo, en algunos casos, los medios de almacenamiento representan un almacenamiento distribuido que se comparte entre una pluralidad de sistemas informáticos diferentes y que incluye espacio de almacenamiento localizado en una pluralidad de sistemas informáticos. Los medios de almacenamiento también pueden comprender cualquier combinación de memoria persistente y volátil.

La Figura 16 también ilustra que el sistema informático se puede conectar en red a uno o más dispositivos diferentes, incluyendo dispositivos de medición, ordenadores localizados de forma remota, servicios remotos y redes remotas. En algunos casos, uno o más de estos dispositivos diferentes llevan a cabo uno o más de los procesos descritos en este documento, de forma que la ejecución de algunos métodos se realiza en un entorno de red distribuido que implica múltiples sistemas y dispositivos informáticos distribuidos.

IX. Ejemplos

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

45 **Ejemplo 1: Estudios de Eficacia de Xenoinjerto con Ab N° 6: Conjunto de Datos de Entrenamiento**

En este ejemplo, se usaron cuatro modelos de xenoinjerto para identificar líneas de células tumorales que respondían al tratamiento con el anticuerpo anti-ErbB3 Ab N° 6. Los cuatro modelos de tumor de xenoinjerto estudiados representan diferentes indicaciones: MALME3M (línea de cáncer de melanoma; ATCC N° HTB-64), ADRr (línea de células de cáncer ovárico; NCI-60, muestra cósmica ID N° 905987), ACHN (línea de células de cáncer renal; ATCC N° CRL-1611) y DU145 (línea de células de cáncer de próstata; ATCC N° HTB-81). Como se describe con más detalle más adelante, los xenoinjertos de MALME3M y ADRr no mostraron una respuesta al tratamiento con Ab N° 6, mientras que los xenoinjertos de ACHN y DU145 mostraron una respuesta frente al tratamiento con Ab N° 6.

En los modelos de tumor de xenoinjerto, se implanta en el flanco derecho de ratones (ratones nu/nu: ratones hembra de 3-4 semanas de edad, deficientes en células T; exogámicos; antecedentes Albino; de Charles River Labs, Wilmington, MA) $3,5 \times 10^6$ - 3×10^8 células/ratón (dependiendo de la línea celular) en 200 μ l a través de inyección subcutánea. Los ratones se supervisan para crecimiento tumoral inicial. Se permite que las células tumorales crezcan durante varios días hasta que el volumen del tumor es aproximadamente 200 mm³. El volumen de tumor se calcula como $V = (\pi/6) (L \times W^2)$. Los ratones se tratan con el anticuerpo Ab N° 6 a una dosis de 600 μ g/inyección cada 3 días (qd3). Los ratones de control se tratan con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

El volumen del tumor se mide durante 60-80 días. Los resultados (obtenidos usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos) del efecto del tratamiento de anticuerpo sobre el crecimiento tumoral se resumen en los gráficos mostrados en las Figuras 1A-1D, que demuestran que el tratamiento con Ab N° 6

inhibió el crecimiento tumoral en los modelos de xenoinjerto de DU145 y ACHN, mientras que el tratamiento con Ab N° 6 no inhibió el crecimiento tumoral (en comparación con el control de PBS) en los modelos de xenoinjerto de ADRr y MALME3M.

- 5 Como una medida de sensibilidad del tumor frente a Ab N° 6, se determina el índice de crecimiento exponencial, el cual describía mejor los datos experimentales. Se usa la siguiente fórmula para describir el crecimiento exponencial.

$$V = V_0 \cdot \exp(k \cdot t)$$

- 10 donde V es el volumen del tumor en mm³, V₀ es el volumen del tumor en tiempo cero, k es el índice de crecimiento exponencial y t es el tiempo en días.

Con el fin de comparar la reducción de crecimiento a través de diferentes estudios de xenoinjerto, se calcula un valor de Reducción de Índice de Crecimiento (RIC) para cada línea de células ensayada, el cual relaciona el Índice de Crecimiento observado en presencia de Ab N° 6 con el índice de crecimiento observado en el grupo de control de PBS usando la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción de Índice de Crecimiento} = 1 - (\text{Índice de Crecimiento Ab N° 6 } k_{\text{Ab N° 6}}) / (\text{Índice de Crecimiento PBS } k_{\text{PBS}})$$

Los valores de RIC de las cuatro líneas de células ensayadas (obtenidos usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos) se resumen en la Tabla 1 más adelante. En el caso de una Reducción de Índice de Crecimiento negativa, el valor de RIC se ajusta a cero.

Tabla 1: Sumario de Reducción de Índice de Crecimiento Tumoral de Conjunto de Entrenamiento de Estudios de Xenoinjerto

<u>Línea Celular</u>	<u>RIC [%]</u>
MALME3M	0
DU145	72,6
ADRr	0
ACHN	28,0

Los resultados demuestran que los cuatro xenoinjertos muestran un intervalo de sensibilidad frente a tratamiento de Ab N° 6, donde las células ADRr y MALME3M no muestran respuesta frente a tratamiento con Ab N° 6, ACHN tiene una sensibilidad de rango medio y las células DU145 tienen la sensibilidad más alta al tratamiento de Ab N° 6.

Ejemplo 2: Niveles de pErbB3 en Lisados de Línea de Células Tumorales se correlacionan con Sensibilidad a Ab N° 6 en Xenoinjertos

En este ejemplo, la concentración de ErbB3 fosforilado (pErbB3) se midió *in vivo* en cada una de las cuatro líneas de células tumorales estudiadas en el Ejemplo 1, MALME3M, ADRr, DU145 y ACHN, en un estudio de farmacodinámica (PD) a corto plazo. El xenoinjerto de OvCAR8 también se incluyó en este experimento (este xenoinjerto muestra ser sensible al tratamiento con Ab N° 6 en el Ejemplo 5 descrito más adelante).

Las células MALME3M, ADRr, DU145, OvCAR 8 y ACHN se desarrollan en cultivo y se recogen para implante (placas de 15 x 15 cm, confluencia ~80%, N° total de células = 2 - 4 x 10⁸) y se mantuvieron en hielo hasta el implante. Las células (aproximadamente 2 x 10⁷ células/ratón) se implantan en 20 ratones (a través de inyección subcutánea, 200 µl de células/inyección/ratón) en el flanco derecho y después se permite que los ratones se recuperen mientras se supervisan para el crecimiento de tumor inicial. Los tumores se miden (L x A) mediante medición con calibrador digital. Una vez que los ratones alcanzaron un volumen de tumor mayor de 100 mm³, los mismos se sometieron a eutanasia mediante asfixia con CO₂ y los tumores de cada ratón se extirpan y se congelan rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras de tejidos tumorales congeladas se almacenan a -80 °C para análisis bioquímico. La cantidad de ErbB3 fosforilado (pErbB3) en los lisados tumorales se determina mediante ELISA usando el kit de ELISA de pErbB3 de R&D Systems Human (N° de Catálogo DYC1769). La preparación de la muestra y los protocolos de ELISA se describen con mayor detalle más adelante.

Para la preparación de la muestra y la extracción de proteína, en primer lugar los tumores congelados se pulverizan y transfieren a criotubos VWR de 2 ml pesados previamente (VWR International). Las muestras pulverizadas se pesan y los pesos se registran. Después del cálculo del peso de la muestra, se añade la cantidad apropiada de tampón de lisis helado a cada tubo hasta una concentración final de 62 mg/ml. Las muestras se someten a agitación vorticial brevemente a velocidad baja y se incuban a 4 °C con rotación.

El lisado tumoral crudo se transfiere posteriormente a Qiagen Qiashredder y se centrifuga a 12000 rpm durante 8 minutos para homogeneización adicional de las muestras. Después de la transferencia de los lisados aclarados en

un tubo fresco, se extrae una pequeña cantidad de cada lisado para ensayo de proteína BCA. El resto del lisado se divide en alícuotas y se almacena a -80 °C para análisis de ensayo de ELISA adicional.

Para cuantificar la proteína total usando un Kit de Ensayo de Proteína BCA (Pierce, N° de Catálogo 23225), en primer lugar se prepara una curva normal de 8 puntos de albúmina sérica bovina (BSA) usando la solución patrón de BSA de 2 mg/ml del kit de BCA, comenzando con la concentración de reserva de 2 mg/ml. Después de mezclar los reactivos A y B del kit (50:1) y preparar diluciones de 3 veces y 5 veces de lisado de tumoral de reserva con PBS, 20 µl de patrón de BSA o de muestra de lisado de tumor diluido y 160 µl de reactivo de trabajo se añaden a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. La placa se incuba a 37° Celsius durante 20 minutos. La DO₅₆₂ se lee y la cantidad total de proteína en los lisados tumorales se calcula usando la curva normal de BSA.

Para llevar a cabo el ELISA de pErbB3, diferentes anticuerpos de captura se diluyen con PBS hasta la concentración de trabajo recomendada por el kit (R&D Systems DYC1769). Después de recubrir placas de 96 pocillos negras (Nunc Maxisorb) con anticuerpos de captura diluidos, todas las placas se incuban a temperatura ambiente (TA) durante una noche. Las placas después se lavan 3 veces con PBST (PBS + Tween-20 al 0,05%) en una lavadora de placa Bio Tek y se bloquean durante 2 horas a TA con 200 µl de BSA al 1% en PBST.

Las proteínas recombinantes para curvas normales se preparan con la concentración más elevada recomendada por el kit y diluciones de 2 veces para un total de 11 puntos. Las placas se lavan 3 veces con PBS y 100 µl de lisados tumorales se añaden antes de incubar durante 2 horas a TA. Después, las placas se lavan 3 veces con PBST y se añaden 100 µl de anticuerpo de detección primaria, diluido hasta la concentración de trabajo en PBS/BSA al 0,1%/Tween-20 al 0,05%. Las placas se incuban adicionalmente a TA durante 2 horas. Finalmente, se añaden 100 µl del Sustrato Quimioluminiscente mezclado SuperSignal ELISA Pico (Pierce, N° de Catálogo 37069) a cada pocillo antes de leer las placas.

La Figura 2 es un gráfico que representa la concentración de pErbB3 en los tumores de xenoinjerto no tratados (en pg/µg de lisado tumoral) frente a la Reducción del Índice de Crecimiento (%—obtenida usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos) observada para los xenoinjertos cuando se trataban con Ab N° 6. La Figura 2 demuestra que existe una buena correlación entre la Reducción del Índice de Crecimiento tumoral y los niveles de pErbB3 constitutivos medidos en los estudios de farmacodinámica a corto plazo. Los xenoinjertos de MALME3M y ADRr, que no respondieron a tratamiento con Ab N° 6, mostraron los niveles más bajos de pErbB3, mientras que los xenoinjertos de ACHN, OvCAR8 y DU145 que respondieron a tratamiento con Ab N° 6, tenían niveles significativamente más elevados de pErbB3. Los resultados demuestran que los niveles de pErbB3 en las células tumorales se correlacionan bien con la sensibilidad de las células tumorales frente al tratamiento con anticuerpo anti-ErbB3.

Ejemplo 3: Los Niveles de pErbB3 y pAKT disminuyen como una Función del Tiempo hasta la Congelación

En este ejemplo, se evaluó la estabilidad de pErbB3 y pAKT, así como también los niveles de expresión de ErbB1, ErbB2 y ErbB3 en lisados tumorales como una función de tiempo después de la resurrección a partir del congelamiento del tumor.

Ratones con xenoinjerto de ACHN y EKVX no tratados se someten a eutanasia mediante asfixia con CO₂ y los tumores se disecan y cortan en 4 trozos y se colocan en nitrógeno líquido en diferentes puntos de tiempo: 0 min, 10 min, 30 min y 60 min. Después se miden los niveles de pErbB3 y pAKT, así como los niveles de ErbB-3, en cada una de las muestras después de la congelación. Los resultados obtenidos usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos se resumen en los gráficos de barras mostrados en las Figuras 3A-3E, con las Figuras 3A y 3B mostrando los niveles de pErbB3 y pAKT, respectivamente, en los lisados de ACHN y las Figuras 3C, 3D y 3E, mostrando los niveles de ErbB1, ErbB2 y ErbB23, respectivamente, en los lisados de EKVX.

Como se muestra en las Figuras 3A y 3B, en las muestras de 10 minutos, ya había una disminución medible en los niveles de pErbB3 y pAKT en comparación con las muestras de 0 minutos. En las muestras de 30 minutos, se observó una disminución en la concentración del 40% para pErbB3 en comparación con el control (congelamiento inmediato del tumor, muestra de 0 minutos) y se observó una disminución en la concentración del 20% para pAKT en comparación con el control. Por el contrario, en los lisados de células tumorales de EKVX y ACHN, los niveles totales de ErbB1-3 permanecieron constantes y no parecieron estar afectados por el tiempo para la congelación (véanse las Figuras 3C-3E). Por tanto, la inestabilidad observada de fosfoproteínas en muestras de tumor y la estabilidad observada de mediciones de proteína total demuestran la ventaja de calcular el nivel de fosforilación de ErbB3, en lugar de medir directamente el nivel en un lisado de células tumorales. El nivel calculado de pErbB3 se denomina el Estado de Activación de Red (NAS) en los siguientes ejemplos usando un modelo computacional mecanicista construido como se ha descrito más adelante en el Ejemplo 4.

Ejemplo 4: Construcción y Entrenamiento de un Modelo Computacional Mecanicista de la Ruta de Señalización de ErbB

En el siguiente ejemplo, se describe la construcción de modelos bioquímicos computacionales mecanicistas de rutas de transducción de señal. En base a la bibliografía del conocimiento acerca de la señalización de ErbB, se desarrolló un modelo computacional mecanicista que comprende todas las interacciones proteína-proteína que describen la unión de ligando al receptor, dimerización, internalización de receptor y degradación, así como también la unión de la molécula adaptadora Gab1 que conduce a la activación de la cascada de PI3K. En la Figura 4A se representa un dibujo de la red de señalización de ErbB implementada. El modelo computacional es un conjunto de ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales (EDO) que usan cinética de acción de masas. La Figura 4B muestra el conjunto de reacciones bioquímicas a partir de la ruta de señalización y la Figura 4C muestra un conjunto de flujos. Las reacciones bioquímicas y los flujos se traducen en un conjunto de EDO no lineales, ilustradas en la Figura 4D. En general, el estado de cambio de una concentración de proteína c_i es igual a la velocidad de producción de la proteína $v_{\text{producción}}$ menos la velocidad de consumo v_{consumo} de la proteína representada en la Ecuación 1.

$$\frac{dc_i}{dt} = \sum v_{\text{producción}} - \sum v_{\text{consumo}} \quad (\text{Ec. 1})$$

El modelo computacional usado para predecir las respuestas frente a Ab N° 6 en los siguientes ejemplos consiste en la red de ErbB de mamífero que incluye los cuatro receptores (ErbB1-4) y la cascada de transducción de señal de Akt.

Los receptores ErbB son receptores de transmembrana de Tipo I de paso único con dominios de unión a ligando extracelulares, un dominio de tirosina quinasa intracelular y una cola citoplasmática que actúa como un andamio de señalización. ErbB1 y ErbB4 son completamente funcionales en la unión a ligando y actividad de tirosina quinasa pero ErbB2 no se une a ningún ligando conocido y funciona en lugar de ello como un amplificador de señal listo para dimerización (Klapper, L.N. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4995-5000). ErbB3 tiene un dominio de quinasa invalidado (Guy, P.M. *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8132-8136) y por lo tanto carece de actividad catalítica, en lugar de ello transduce señales cuando se fosforila por otros receptores ErbB. De los 13 ligandos de ErbB conocidos, BTC y HRG se han implementado como ligandos que inducían los niveles de fosforilación de ErbB23 más elevados. Los 13 ligandos de ErbB conocidos se pueden dividir en tres grupos: (i) aquellos que se unen específicamente a ErbB1, tales como EGF, factor del crecimiento transformante alfa ($\text{TGF}\alpha$) y anfirregulina (AR), (ii) aquellos que muestran especificidad doble, uniéndose tanto a ErbB1 como a ErbB4, que incluyen BTC, HB-EGF, EPG y EPR y (iii) las neurregulinas (NRG), que caen en dos subgrupos: NRG1 (también conocido como GGF2, SMDF o HRG) que se une a ErbB3/ ErbB4, una proteína compartida también con NRG2 y NRG3/NRG4 que se une a ErbB4 en solitario. A continuación de la unión a ligando, los receptores dimerizan y experimentan transfosforilación en los restos en sus colas citoplasmáticas, creando de ese modo sitios de anclaje para moléculas adaptadoras que contienen SH2 tales como Shc, Grb2, GAP, Sos y PI3K. ErbB1 tiene al menos 20 sitios de fosforilación de tirosina en su cola citoplasmática, 12 de los cuales se han propuesto para acompañar a proteínas adaptadoras que contienen SH2 y enzimas (Schulze, W.X. *et al.* (2005) *Mol. Syst. Biol.* 1: 2005-2008). Otros receptores ErbB experimentan igualmente modificación pos-traducciona compleja. Los adaptadores asociados a receptor tales como Grb2 y PI3K activan RAS y en última instancia activan ERK y AKT. AKT también se puede activar de una manera independiente de RAS a través de la unión directa de PI3K-p85 a sitios múltiples en ErbB3.

Aunque se han publicado varios modelos computacionales (véanse, por ejemplo, Kholodenko, B.N. *et al.* (1999) *J. Biol. Chem.* 274: 30169-30181; Hatakeyama, M. *et al.* (2003) *Biochem. J.* 373: 451-463; Resat, H. *et al.* (2003) *Biophys. J.* 85: 730-743; Hendriks, B.S. *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* 280: 6157-6169; Sasagawa, S. *et al.* (2005) *Nat. Cell. Biol.* 7: 365-373; Birtwistle, M.R. *et al.* (2007) *Molecular Systems Biology* 3: 144), el modelo computacional usado en el presente documento es más exhaustivo e incluye los cuatro receptores ErbB y dos clases diferentes de ligandos (HRG y BTC) mientras que, sin embargo, mantiene el rigor de una formulación de acción de masas basada en reacciones elementales.

Siete hetero y homodímeros de ErbB que se han descrito en la bibliografía se implementaron en el modelo: ErbB1/1, ErbB1/2, ErbB1/3, ErbB1/4, ErbB2/2, ErbB2/3 y ErbB2/4. La mayoría de estos dímeros se activan mediante unión a ligando pero varios surgen a través de un proceso de "señalización lateral" (o dimerización secundaria) en el cual dímeros fosforilados de una manera dependiente de ligando se disocian en monómeros y después homo o hetero-oligomerizan con monómeros activados o inactivos para crear dímeros activos. El modelo computacional se entrenó con un conjunto de datos experimentales que permitieron la identificación de los dímeros que se forman en presencia de HRG o BTC usando la línea de células ADRr.

El modelo computacional se basa en ecuaciones diferenciales ordinarias no lineales, que requieren dos tipos de parámetros que se tienen que medir o estimar: número de especies iniciales y constantes de velocidad. Antes de la calibración del modelo, se especificaron los valores de tantos parámetros como fuera posible en base a información de bibliografía, por ejemplo, las constantes de unión de ligandos a sus receptores afines. Usando análisis qFACS, se cuantificaron los niveles de expresión de los receptores ErbB a través de todas las líneas celulares usadas en esta

aplicación. Además, se usó ELISA para cuantificar los niveles de BTC y pErbB3. Adicionalmente, se determinaron los niveles de ARNm de HRG- β 1 en comparación con los niveles de ARNm en la línea de células ZR-75 (ATCC N° CRL-1500). Los niveles de expresión de receptor y ligando, información que se usa en el modelo computacional, se resumen en la Tabla 2 más adelante. Las metodologías para obtener estos niveles de expresión se describen con mayor detalle más adelante.

Las líneas celulares tumorales se obtienen en el Instituto Nacional del Cáncer. Todas las líneas celulares se cultivan como cultivos monocapa en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, el 95% de aire y 37 grados Celsius en medios completos: medio RPMI-1640 (Gibco), complementado con suero fetal de ternera al 10% (FCS) (Hyclone), L-glutamina 2 mM (Gibco) y unidades/ml de Pen-Strep (Gibco).

Los niveles de expresión de receptor se cuantifican usando el Kit Quantum Simply Cellular 816A (Bangs Laboratories), que permite la cuantificación de niveles de expresión de receptor mediante qFACS. El mismo contiene una serie de 4 poblaciones microesferas marcadas con cantidades variables de anti-IgG humana de cabra más una población de blanco. La IgG conjugada a la superficie de las perlas es específica para las partes Fc de los anticuerpos de IgG. Las perlas se tiñen igual que las muestras de células y con el mismo anticuerpo. Cada una de las poblaciones diferentes de microesferas se une a una cantidad conocida del anticuerpo monoclonal marcado. Mediante la representación de la intensidad de fluorescencia de cada población frente a su valor de Capacidad de Unión al Anticuerpo asignado (CUA) se genera una curva de CUA convencional y la CUA de muestras de células teñidas se determina fácilmente usando el software proporcionado por Bangs Laboratories (QuickCal v 2.3). Este programa tiene en cuenta la marca del instrumento usado, el voltaje para esa muestra y el fluorocromo usado.

Los niveles de expresión de BTC se miden mediante ELISA usando el Kit de Betacelulina humana de R&D Systems Dy261 DuoSet-IC. Una placa de 384 pocillos se recubre con 4 μ g/ml de anticuerpo de captura. La placa de 384 pocillos se bloquea añadiendo 50 μ l de BSA al 2%/PBS 1X (sin Tween-20) durante 1 hora y se prepara una curva normal recombinante. Después de lavar las placas, se añaden 16 μ l de lisados celulares, así como también anticuerpo de detección Anti- Fosfo- Tirosina- HRP (peroxidasa de rábano picante), seguido por incubación durante 2 horas. Finalmente se añaden 20 μ l de sustrato luminiscente Pico y las placas se leen espectrofotométricamente.

Ya que los ensayos disponibles en el mercado para medir los niveles de expresión de proteína HRG- β 1 no eran suficientemente sensibles para obtener datos fiables para las líneas celulares examinadas, los niveles de ARNm de HRG- β 1 se cuantificaron para las líneas celulares de interés. El ARN se aísla a partir de los lisados celulares usando el protocolo RNeasy Mini (74104 RNEASY KIT de QUIAGEN). Después convertir ARN aislado en ADNc y preparar una mezcla maestra para PCR cuantitativa (QPCR) usando la mezcla Maestra de Applied Biosystems 430443 7 Tagman, se desarrolla QPCR y se cuantifica la expresión de ARNm de HRG- β 1 con relación a los niveles de ARNm en células ZR75-1. Los cebadores de QPCR se adquieren en Applied Biosystems.

Los niveles de fosforilación de ErbB3 para las diferentes líneas celulares mostrados en la Tabla 2 se determinan usando el kit de ELISA de pErbB3 de R&O (Dyc1769- 2 DuoSet- IC human phospho- ErbB3), usando los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 2 o variaciones menores del mismo.

La Tabla 2 resume la información del nivel de expresión del receptor y ligando obtenida para las diferentes líneas celulares usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores del mismo, información que se usó en la construcción del modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB. La columna 1 muestra el nombre de la línea celular; la columna 2 muestra el tipo de tumor, las columnas 3-5 muestran el número de receptores por célula para ErbB1, ErbB2 y ErbB3, respectivamente; la columna 6 muestran los niveles de ARNm de HRG- β 1, expresados como las veces en comparación con los niveles de ARNm en células ZR-75; y las columnas 7 y 8 muestran la cantidad de BTC y pErbB3 presentes en las células expresadas como pg/célula.

Tabla 2: Resumen de Niveles de Expresión de Receptor y Ligando para las Líneas Celulares Usadas en Experimentos de Xenoinjerto

Línea celular	Tipo de tumor	ErbB1 N° /célula	ErbB2 N° /célula	ErbB3 N° /célula	Veces de HRG b-1 en comparación con ZR-75	BTC pg/célula	pErbB3 pg/célula
ACHN	renal	448283,5	45455,75	15200	2544,794306	3,34191 E-05	4,15E-05
ADRR	mamario	177817,5	40792	33204,5	226	1,14529E-08	1,80E-05
DU145	próstata	437841,25	69068	19422	2,219138944	9,87522E-06	1,50E-04
IGROV1	ovárico	149031,25	158417,5	5355,25	0	2,61392E-06	ND

Línea celular	Tipo de tumor	ErbB1	ErbB2	ErbB3	Veces de HRG b-1 en comparación con ZR-75	BTC	pErbB3
		Nº /célula	Nº /célula	Nº /célula		pg/célula	pg/célula
MALM E3M	melanoma	2914,2	56422	67367	0,438302861	6,71181E-08	7,90E-06
OVCAR8	ovárico	236156,75	53272,25	31812,75	343,3017338	5,8861E-07	ND
SKOV3	ovárico	264132	1377660,5	13693,5	340	1,63191 E-05	ND

Para el entrenamiento del modelo computacional, se usó un conjunto de datos que comprende matrices de dosis-tiempo en las cuales se mide la fosforilación de ErbB1, ErbB2, ErbB3 y AKT en puntos de tiempo múltiples y a nueve concentraciones diferentes de estimulación con BTC o HRG en células ADRr mediante ELISA. Para estimulación de las células, las células se siembran en 100 μ l de medios completos a 35.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos y se incuban durante una noche en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, aire al 95% y 37 grados Celsius. Las células después se cambian a medio sin suero: medio RPMI-1640 (Gibco) complementado con L-glutamina 2 mM (Gibco) y unidades/ml de Pen-Strep (Gibco). Las células en inanición se incuban en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, aire al 95% y 37 grados Celsius durante 20-24 horas antes de la estimulación. Para los estudios de matriz de dosis-tiempo, las células se estimulan con ligando (BTC o HRG) a 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. A continuación de la estimulación con 9 concentraciones diferentes de HRG (0,038 nM-250 nM) y BTC (0-700 nM) para cada curso de tiempo, las células se colocan en hielo, se lavan con PBS frío, después se lisan en 30 μ l de Tampón de Extracción de Proteína de Mamífero M-PER frío (Thermo Scientific, N° Catálogo 78501) complementado con cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, P2714), ortovanadato de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, S6508), pirofosfato de sodio 5 mM (Sigma-Aldrich, 221368), oxofenilarsina 50 μ M (EMD Biosciences, 521000) y bpV 10 μ M (phen) (EMD Biosciences, 203695).

Los niveles de fosforilación de proteína en las células estimuladas se miden mediante ELISA. Los anticuerpos de captura frente a ErbB1 (R&D Systems, AF231), ErbB2 (R&D Systems, MAB1129), ErbB3 (R&D Systems, MAB3481) y AKT (Upstate 05-591MG) se incuban en placas de unión elevada de poliestireno de fondo plano negras de 384 pocillos (Coming, N° de Catálogo 3708) durante una noche a temperatura ambiente. Las placas de ELISA se bloquean con albúmina sérica bovina al 2% (BSA) y solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante una hora y después se incuban con lisados diluidos en BSA al 2%, Tween-20 al 0,1% y PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Entre cada incubación, las placas se lavan tres veces con Tween-20 al 0,05% en PBS. Los ELISA para medir fosfo-ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se incuban con anticuerpo monoclonal enlazado a peroxidasa de rábano picante (HRP) fosfotirosina (R&D Systems, HAM1676) durante dos horas. Los ELISA para medir fosfo-AKT se incuban con anticuerpo monoclonal anti-fosfo AKT de ratón específico de serina 473 primario (Cell Signaling Technologies, N° de Catálogo 5102) durante 2 horas, después se incuban con Estreptavidina-HRP (R&D Systems, N° de Catálogo DY998) durante 30 minutos. Todos los ELISA se visualizan con sustrato Quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Pierce, N° de Catálogo 37069) y la señal luminiscente se mide usando un luminómetro.

Los resultados (obtenidos usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos) para el conjunto de datos de la fosforilación de la proteína en múltiples puntos de tiempo y nueve concentraciones diferentes de BTC o HRG se muestran en las Figuras 5A-5B, donde la Figura 5A muestra los niveles de fosfo-ErbB3, fosfo-ErbB2, fosfo-ErbB3 y fosfo-AKT para células estimuladas con HRG y la Figura 5B muestra los niveles de fosfo-ErbB3, fosfo-ErbB2, fosfo-ErbB3 y fosfo-AKT para células estimuladas con BTC. Este conjunto de datos se usó para calibrar el modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB de forma que los resultados de simulación (líneas) describen los datos experimentales (puntos) mostrados en las Figuras 5A-5B.

Más adelante se proporciona información adicional acerca del desarrollo de un modelo computacional de la red de señalización del receptor ErbB:

Estructura del Modelo

El modelo de red de señalización de receptor ErbB consiste en tres receptores (ErbB1, ErbB2, ErbB3), una fosfatasa receptora, fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K, que se une a los receptores) y componentes de la cascada de PI3K-AKT (fosfatidilinositol bisfosfato, PIP2, proteína quinasa dependiente de fosfoinositida, PDK1, PTEN suprimido del cromosoma 10, PTEN, serina, treonina proteína quinasa también conocida como proteína quinasa B, AKT, Proteína fosfatasa 2A, PP2A) (Véase la Tabla 8 más adelante). Se incluyeron dos ligandos de receptor ErbB: heregulina (HRG1- β) que se une a ErbB3 y ErbB4 (no incluido en el modelo debido que los niveles de expresión de ErbB4 eran muy difíciles de detectar en líneas celulares (véase Tabla 3 más adelante) y Betacelulina (BTC), que se une principalmente a ErbB1 (Beerli, R.R. y Hynes, N.E. (1996) J. Biol. Chem. 271: 6071-6076; Jones, J.T. *et al.* (1999) FEBS Lett. 447: 227-231). Las reacciones de cinética de acción de masas, enumeradas por completo en la Tabla 11 más adelante, se convirtieron en ecuaciones diferenciales ordinarias usando Matlab Simbiology 2.3 (Mathworks, MA).

En el modelo se incluyeron dimerización, internalización, reciclaje y degradación inducida por ligando como se describe en la bibliografía para todos los homo- y heterodímeros (Hendriks, B.S. *et al.* (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 23343- 23351; Wang, Z. *et al.* (1999) *Mol. Biol. Cell* 10: 1621- 1636). Las estabildades de dímero receptor, usando la escala publicada en Shankaran, H. *et al.* (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371: 220- 224, se implementaron, donde la coexpresión de ErbB1 con ErbB2 o ErbB3 desvía la señalización a la superficie celular y retarda la regulación negativa de la señal y donde la coexpresión simultánea de ErbB1-3 conduce a una abundancia de heterodímeros ErbB2-ErbB3. Por lo tanto, los dímeros que contienen ErbB3 se internalizan y degradan más lentamente que los homodímeros de ErbB1 o heterodímeros ErbB1-ErbB2. La dimerización constitutiva también estaba incluida, aunque se asumió que los dímeros sin ligando no desencadenaban ninguna señalización cadena abajo (Yu, X. *et al.* (2002) *Mol. Biol. Cell* 13: 2547-2557) y que permanecían en la superficie celular. Los ligandos de ErbB se unen con afinidades diferentes a homo- y heterodímeros de ErbB (Teramura, Y. *et al.* (2006) *EMBO J.* 25: 4215-4222), pero con el fin de reducir el número de parámetros de cinética que se tienen que estimar y describir los datos experimentales con el modelo más sencillo posible, limitamos la afinidad de unión de los ligandos para homo- y heterodímeros de ErbB a que fuera la misma.

Los receptores dimerizados experimentan fosforilación rápida y activan rutas cadena abajo a través de la unión de adaptadores de señalización a sitios de fosfotirosina en la cola citoplasmática del receptor (Yarden Y. y Slivkowski, M.X. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 127-137). Aquí, se implementó una cascada de PI3K-AKT simplificada, mediante lo cual PI3K se une directamente a heterodímeros unidos a ligando, activa PIP2, que forma un complejo con PDK1 y AKT, conduciendo a una fosforilación doble de dos etapas de AKT. ErbB3 tiene seis sitios de unión a PI3K, mientras que los otros receptores ErbB únicamente tienen uno (Wallasch, C. *et al.* (1995) *EMBO J.* 14: 4267-4275; Soltoff, S.P. *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 3550- 3558). Aunque no se conoce si seis moléculas de PI3K se pueden unir simultáneamente a ErbB3, PI3K se activa 10-20 veces más fuertemente por ErbB3 (Fedi, P. *et al.* (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14: 492-500) que por los otros receptores. También existe evidencia de que PI3K se une a ErbB3 con mayor afinidad que a los otros receptores ErbB (Jones, R.B. *et al.* (2006) *Nature* 439: 168- 174). Incorporamos estos fenómenos en el modelo y evitamos la complejidad combinatoria de incluir seis sitios de unión, imponiendo las siguientes estipulaciones sobre dímeros que contienen ErbB3: un índice de unión a PI3K potenciado; índice de unión de PIP2 a PI3K potenciado e índice de activación potenciado de PIP3. PIP2 no está presente en los endosomas (Haugh, J.M. (2002) *Mol. Interv.* 2: 292-307), por tanto, únicamente los dímeros de receptor unidos a membrana plasmática son capaces de activar PIP2 en el modelo. Las simulaciones iniciales aceleraron la activación de AKT muy lentamente, haciendo necesario desactivar casi completamente la AKT fosfatasa antes de la simulación e incorporar un bucle de retorno negativo mediante el cual AKT activa su propia fosfatasa, un fenómeno descrito en otros sitios (Camps, M. *et al.* (1998) *Science* 280: 1262-1265). La cascada de MAPK se omitió tanto por simplicidad como debido a nuestros hallazgos recientes de que la señalización de AKT es relativamente insensible a especies y parámetros en la cascada de MAPK (Chen, W.W. *et al.* (2009) *Mol. Syst. Biol.* 5: 239); por lo tanto, la comunicación de MAPK-PI3K no es necesaria para describir la dinámica de señalización de AKT. Los valores de especies iniciales se midieron directamente (receptores ErbB, PDK1, AKT), se infirieron a partir de la bibliografía (Birtwistle, M.R. *et al.* (2007) *Mol. Syst. Biol.* 3: 144; Hatakeyama, M. *et al.* (2003) *Biochem. J.* 373: 451-453) o se ajustaron a valores no limitantes de la velocidad.

Calibración de modelo

Muchos de los parámetros de velocidad de reacción se desconocen en el sistema celular estudiado y por lo tanto se tenían que estimar (véase la Tabla 10 más adelante). Para evitar la desviación del punto de partida, todos los parámetros se ajustaron a los valores por defecto (Aldridge, B.B. *et al.* (2006) *Nat. Cell. Biol.* 8: 1195-1203). El número de parámetros estimados se limitó realizando la estimación en dos etapas: en primer lugar el modelo se calibró frente a los datos de fosforilación de receptor ErbB observados experimentalmente; en segundo lugar, los parámetros sensibles a fosforilación de AKT se optimizaron frente a los datos experimentales. Los valores estimados se aceptaron únicamente si los parámetros se limitaban en múltiples ejecuciones de parámetros usando un algoritmo genético con un tamaño de población de 50 y 25 generaciones (Mathworks, MA). Las constantes de velocidad de unión de ligando de HRG1- β y BTC se estimaron por separado usando K_d (Tzahar, E. *et al.* (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16: 5276-5287; Singer, E. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 44266-44274; Jones, J.T. *et al.* (1999) *FEBS Lett.* 447: 227-231) y curvas de dosis respuesta iniciales para aproximarse a una velocidad de unión directa de $1 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ para ambos ligandos. Los análisis de sensibilidad (Mathworks, MA) se realizaron para identificar parámetros que influyen de forma marcada sobre las actividades de fosforilación de ErbB1, ErbB2, ErbB3 y AKT con estimulación de HRG1- β o BTC (véase la Tabla 11 más adelante). Se permitió que cada parámetro variara por separado mientras el sistema se estimulaba con 1 nM de HRG1- β o BTC. Las sensibilidades normalizadas de cada especie se integraron a lo largo de la estimulación de dos horas y los parámetros con sensibilidades normalizadas e integradas mayores que un umbral arbitrario de 1000 se enumeran en la Tabla 11 más adelante. Como se ha mencionado anteriormente, la fosforilación de ErbB4 no se incluyó en la estimación de parámetros debido a que la línea celular estudiada tenía ErbB4 apenas detectable (véase la Tabla 3 más adelante). Las reacciones de ErbB4 se parametrizan de acuerdo con las reacciones de ErbB3.

Los perfiles de fosforilación de receptor ErbB eran sensibles a parámetros de dimerización, internalización, reciclaje y degradación (las reacciones enzimáticas, disociación de dímeros y constantes de velocidad de fosfatasa no eran sensibles). Estos parámetros se ajustaron usando un conjunto de datos de alta densidad. Cada lectura se normalizó

a la activación máxima conseguida por cualquier ligando, conservando la potencia relativa de cada ligando. Las velocidades de dimerización de receptor ErbB se limitaron de forma estricta y se observaron relaciones de parámetros que igualaban a los hallazgos de la bibliografía: ErbB2 es el compañero de dimerización preferido para ErbB1 o ErbB3 (más notablemente con estimulación de heregulina). A partir de los datos disponibles, no fue posible

5 limitar las velocidades tanto de reciclaje como de internalización; por lo tanto las velocidades de reciclaje se ajustaron a $0,005 \text{ s}^{-1}$ y únicamente las velocidades de internalización se ajustaron: las observaciones resultantes por lo tanto se aplican de forma igual a velocidades de reciclaje (a la inversa). Las velocidades de internalización variaron en base a estímulos de ligando, con los dímeros unidos a HRG1- β mostrando internalización mucho más

10 lenta que homo- y heterodímeros unidos de BTC, una visión apoyada en otros lugares (Sorkin, A. y Goh, L.K. (2008) Exp. Cell Res. 314: 3093-3106). Las velocidades de degradación también estaban bien limitadas, pero fueron similares para todos los dímeros, sugiriendo que las velocidades de degradación de dímero individual no son necesarias para explicar los datos observados. AKT fosforilado es sensible a muchos parámetros dentro de la cascada de PI3K y al nivel de receptor (véase la Tabla 11 más adelante). Por lo tanto, limitamos la calibración a

15 parámetros de modelo que estaban en la cascada de PI3K-AKT y se entrenaron frente a los cursos de tiempo de fosforilación de AKT mientras bloqueamos los valores de parámetros que ya estaban entrenados en los perfiles de receptor ErbB.

A continuación del entrenamiento de modelo, se llevó a cabo un ajuste local y manual de los parámetros para descifrar el impacto de cada parámetro, para determinar si eran posibles mejoras adicionales y para limitar los

20 parámetros a valores biológicamente plausibles. Para estandarización, los parámetros se redondearon y se condensaron a valores similares cuando se conservaban a través de un tipo de parámetro (como se ha explicado para las velocidades de degradación).

Implementación de inhibidor

Se incluyeron inhibidores de ErbB en el modelo usando la interpretación más sencilla de mecanismos de acción conocidos (véase la Tabla 12 más adelante): el anticuerpo monoclonal anti-ErbB3 Ab N° 6 secuestra ErbB3 evitando

25 la unión a ligando e induce la internalización y degradación; cetuximab secuestra ErbB1 y evita la unión a ligando; lapatinib inhibe la activación de receptores ErbB pero no la dimerización o unión a ligando; y pertuzumab bloquea la dimerización de ErbB2. Para Ab N° 6, se usaron las constantes de velocidad medidas mediante Kinexa y para los

30 otros inhibidores se usaron las constantes de velocidad indicadas en la bibliografía (Wood, E.R. *et al.* (2004) Cancer Res. 64: 6652-6659; Patel, D. *et al.* (2007) Anticancer Res. 27: 3355-3366; Adams, C.W. *et al.* (2006) Cancer Immunol. Immunother. 55: 717-727) y enumeradas en la Tabla 13 más adelante; los parámetros de cetuximab se confirmaron experimentalmente mediante Kinexa.

En las Tablas 3-13 más adelante se expone información adicional diversa usada en el desarrollo del modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB, de la forma siguiente:

Tabla 3: Expresión de receptor ErbB medida y estado de mutación para líneas celulares investigadas

línea celular	Tipo de tumor	Abundancia de ErbB (moléculas/célula) ^{Nº}				Estado de mutación*		
		ErbB1	ErbB2	ErbB3	ErbB4	KRAS	PI3K	PTEN
ADRR	ovárico	177818	40792	33205	2094	ninguno	ninguno	ninguno
OvCAR8	ovárico	236157	53272	31813	ND	ninguno	ninguno	ninguno
ACHN	renal	448284	45456	15200	2086	ninguno	ninguno	ninguno
MALME-3M	melanoma	2914	56422	67367	584	ninguno	ninguno	ninguno
DU145	próstata	437841	69068	19422	ND	ninguno	ninguno	ninguno
ND - no detectable								
Nº - medido por qFACS								
* Sitio Web usado para determinar el estado de mutación de las líneas celulares investigadas - http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/core_line_viewer?action=nci60_list								

Tabla 4: Caracterización de curvas de dosis respuesta de fosforilación de ErbB1 para ligandos de unión a ErbB1 y HRG1- β .

pErbB1	NCI-ADRR	% de estimulación a 5 min con relación al máximo
EGF	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	6,0 2,5-14
HB-EGF	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	21,0 12-38
Epigen	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND 12,0

pErbB1		NCI-ADRr	% de estimulación a 5 min con relación al máximo
AR	CE ₅₀ [nM]	37,0	95,0
	IC del 95%	21-68	
BTC	CE ₅₀ [nM]	5,7	100,0
	IC del 95%	2,3-14	
TGFa	CE ₅₀ [nM]	30,0	100,0
	IC del 95%	10-87	
Epirregulina	CE ₅₀ [nM]	ND	9,0
	IC del 95%		
HRG1-P	CE ₅₀ [nM]	ND	0,0

ND: no se pudo determinar
IC: Intervalo de confianza del 95%

Tabla 5: Caracterización de curvas de dosis respuesta de fosforilación de ErbB2 para ligandos de unión a ErbB1 y HRG1-beta

5

pErbB2		NCI-ADRr	% de estimulación a 5 min con relación al máximo
EGF	CE ₅₀ [nM]	27,0	100,0
	IC del 95%	15-51	
HB-EGF	CE ₅₀ [nM]	230,0	94,0
	IC del 95%	74-730	
Epigen	CE ₅₀ [nM]	ND	25,0
	IC del 95%		
AR	CE ₅₀ [nM]	ND	54,0
	IC del 95%		
BTC	CE ₅₀ [nM]	27,0	94,0
	IC del 95%	4-190	
TGFa	CE ₅₀ [nM]	41,0	36,0
	IC del 95%	20-86	
Epirregulina	CE ₅₀ [nM]	ND	18,0
	IC del 95%		
HRG1-P	CE ₅₀ [nM]	7,0	43,0
	IC del 95%	2,1-23	

ND: no se pudo determinar
IC: Intervalo de confianza del 95%

Tabla 6: Caracterización de curvas de dosis respuesta de fosforilación de ErbB3 para ligandos de unión a ErbB1 y HRG1-beta

10

pErbB3		NCI-ADRr	% de estimulación a 5 min con relación al máximo
EGF	CE ₅₀ [nM]	ND	7,0
	IC del 95%		
HB-EGF	CE ₅₀ [nM]	ND	32,0
	IC del 95%		
Epigen	CE ₅₀ [nM]	ND	3,0
	IC del 95%		
AR	CE ₅₀ [nM]	380,0	17,0
	IC del 95%	240-600	
BTC	CE ₅₀ [nM]	100,0	35,0
	IC del 95%	47-220	
TGFa	CE ₅₀ [nM]	ND	9,0
	IC del 95%		
Epirregulina	CE ₅₀ [nM]	ND	22,0
	IC del 95%		
HRG1-P	CE ₅₀ [nM]	9,9	100,0
	IC del 95%	7,9-12	

pErB3	NCI-ADr	% de estimulación a 5 min con relación al máximo
-------	---------	---

ND: no se pudo determinar

IC: Intervalo de confianza del 95%

Tabla 7: Caracterización de curvas de dosis respuesta de fosforilación de AKT para ligandos de unión a ErbB1 y HRG1-beta

pAKT		NCI-ADDr	% de estimulación a 5 min con relación al máximo
EGF	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND	26,0
HB-EGF	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND	20,0
Epigen	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND	11,0
AR	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	0,0 0,064-27	28,0
BTC	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND	22,0
TGFa	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND	27,0
Epirregulina	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	ND	11,0
HRG1-P	CE ₅₀ [nM] IC del 95%	1,9 0,23-17,1	100,0

ND: no se pudo determinar

IC: Intervalo de confianza del 95%

5

Tabla 8: Cantidades iniciales de especies no cero en el modelo computacional

Nombre de especie	Cantidad inicial	Descripción adicional
HRG	variable	Heregulina
BTC	variable	Betacelulina
E1	178000	ErbB1
E2	41000	ErbB2
E3	33000	ErbB3
RTKpasa	500000	receptor tirosina quinasa fosfatasa
PI3K	800000	fosfatidilinositol 3-quinasa
PIP2	700000	fosfatidilinositol bisfosfato
PTEN	350000	PTEN suprimido en cromosoma 10
PDK1	9500000	proteína quinasa dependiente de fosfoinositida
AKT	900000	Serina, treonina proteína quinasa también conocida como proteína quinasa B
PP2A	4000	proteína fosfatasa 2A (AKT fosfatasa)
PP2Aoff	64000	AKT fosfatasa inactiva

Tabla 9: Resumen de reacciones bioquímicas implementadas en el modelo computacional usando cinética de acción de masas con parámetros correspondientes

10

Definición de abreviaciones usadas:

:	indica un complejo de proteína, por ejemplo ligando unido a receptor
_p	indica que una proteína está fosforilada
iy	indica que una especie y está internalizada
<->	indica una reacción reversible
->	indica una reacción irreversible

(continuación)

Número de reacción	Reacción	Parámetro directo	Parámetro inverso
Unión a ligando			
v1	HRG + E3 <-> [E3:HRG]	kf1	kr1
v2	HRG + [E2:E3] <-> [E2:E3:HRG]	kf2	kr2
v3	BTC + E1 <-> [BTC:E1]	kf3	kr3
v4	BTC + [E1:E1] <-> [BTC:E1:E1]	kf4	kr3
v5	BTC + [E1:E2] <-> [BTC:E1:E2]	kf5	kr3
v6	BTC + [E1:E3] <-> [BTC:E1:E3]	kf5	kr3
Dimerización			
v7	[E3:HRG] + E2 <-> [E2:E3:HRG]	kf7	kr7
v8	[E3:HRG_p] + E2_p <-> [E2:E3:HRG_p]	kf7	kr7
v9	[E3:HRG_p] + E2 -> [E2:E3:HRG_p]	kf7	
v10	[E3:HRG] + E1 <-> [E1:E3:HRG]	kf10	kr7
v11	[E3:HRG_p] + E1 <-> [E1:E3:HRG_p]	kf10	kr7
v12	E2_p + E2 -> [E2:E2_p]	kf12	
v13	E2_p + E2_p <-> [E2:E2_p]	kf12	kr12
v14	[BTC:E1] + E1 <-> [BTC:E1:E1]	kf14	kr14
v15	[BTC:E1_p] + E1 <-> [BTC:E1:E1_p]	kf14	kr14
v16	[BTC:E1] + [BTC:E1] <-> [BTC:E1:E1:BTC]	kf16	kr16
v17	[BTC:E1_p] + [BTC:E1] <-> [BTC:E1:E1:BTC_p]	kf16	kr16
v18	[BTC:E1_p] + [BTC:E1_p] <-> [BTC:E1:E1:BTC_p]	kf16	kr16
v19	[BTC:E1] + E2 <-> [BTC:E1:E2]	kf19	kr19
v20	[BTC:E1] + E2_p -> [BTC:E1:E2_p]	kf19	
v21	[BTC:E1_p] + E2_p <-> [BTC:E1:E2_p]	kf19	kr19
v22	[BTC:E1_p] + E2 -> [BTC:E1:E2_p]	kf19	

(continuación)

Dimerización

v23	[BTC:E1] + E3 <-> [BTC:E1:E3]	kf23	kr19
v24	[BTC:E1_p] + E3 <-> [BTC:E1:E3_p]	kf23	kr19
v25	E3 + E2 <-> [E2:E3]	kf12	kr12
v26	E3 + E1 <-> [E1:E3]	kf12	kr12
v27	E1 + E2 <-> [E1:E2]	kf12	kr12
v28	E1 + E1 <-> [E1:E1]	kf12	kr12
v29	E2 + E2 <-> [E2:E2]	kf12	kr12

Fosforilación y desfosforilación

v30	[E2:E3:HRG] -> [E2:E3:HRG_p]	kf30	
v31	[E1:E3:HRG] -> [E1:E3:HRG_p]	kf30	
v32	[BTC:E1:E1] -> [BTC:E1:E1_p]	kf30	
v33	[BTC:E1:E1:BTC] -> [BTC:E1:E1:BTC_p]	kf30	
v34	[BTC:E1:E2] -> [BTC:E1:E2_p]	kf30	
v35	[BTC:E1:E3] -> [BTC:E1:E3_p]	kf30	
v36	[E3:HRG_p] -> HRG + E3	kr1	
v37	[BTC:E1_p] -> BTC + E1	kr3	
v38	[E2:E3:HRG_p] + RTKpase <-> [E2:E3:HRG_p:RTKpase]	kf38	kr38
v39	[E1:E3:HRG_p] + RTKpase <-> [E1:E3:HRG_p:RTKpase]	kf38	kr38
v40	[BTC:E1:E1_p] + RTKpase <-> [BTC:E1:E1_p:RTKpase]	kf38	kr38
v41	[BTC:E1:E1:BTC_p] + RTKpase <-> [BTC:E1:E1:BTC_p:RTKpase]	kf38	kr38
v42	[BTC:E1:E2_p] + RTKpase <-> [BTC:E1:E2_p:RTKpase]	kf38	kr38
v43	[BTC:E1:E3_p] + RTKpase <-> [BTC:E1:E3_p:RTKpase]	kf38	kr38
v44	[E2:E2_p] + RTKpase <-> [E2:E2_p:RTKpase]	kf38	kr38

(continuación)

Fosforilación y desfosforilación

v45	[E2:E3:HRG_p:RTKpase] -> [E2:E3:HRG] + RTKpase	kf45	
v46	[E1:E3:HRG_p:RTKpase] -> [E1:E3:HRG] + RTKpase	k45	
v47	[BTC:E1:E1_p:RTKpase] -> [BTC:E1:E1] + RTKpase	kf45	
v48	[BTC:E1:E1:BTC_p:RTKpase] -> [BTC:E1:E1:BTC] + RTKpase	kf45	
v49	[BTC:E1:E2_p:RTKpase] -> [BTC:E1:E2] + RTKpase	kf45	
v50	[BTC:E1:E3_p:RTKpase] -> [BTC:E1:E3] + RTKpase	kf45	
v51	[E2:E2_p:RTKpase] -> [E2:E2] + RTKpase	kf45	

Unión de PI3K y activación de PIP2

v52	[E2:E3:HRG_p] + PI3K <-> [E2:E3:HRG_p:PI3K]	kf52	kr52
v53	[E1:E3:HRG_p] + PI3K <-> [E1:E3:HRG_p:PI3K]	kf52	kr52
v54	[E2:E2_p] + PI3K <-> [E2:E2_p:PI3K]	kf54	kr54
v55	[BTC:E1:E1_p] + PI3K <-> [BTC:E1:E1_p:PI3K]	kf54	kr54
v56	[BTC:E1:E1:BTC_p] + PI3K <-> [BTC:E1:E1:BTC_p:PI3K]	k-f54	kr54
v57	[BTC:E1:E2_p] + PI3K <-> [BTC:E1:E2_p:PI3K]	kf54	kr54
v58	[BTC:E1:E3_p] + PI3K <-> [BTC:E1:E3_p:PI3K]	kf52	kr52
v59	[E2:E3:HRG_p:PI3K] + PIP2 <-> [E2:E3:HRG_p:PI3K:PIP2]	kf59	kr59
v60	[E1:E3:HRG_p:PI3K] + PIP2 <-> [E1:E3:HRG_p:PI3K:PIP2]	kf59	kr59
v61	[E2:E2_p:PI3K] + PIP2 <-> [E2:E2_p:PI3K:PIP2]	kf61	kr61

(continuación)

Unión de PI3K y activación de PIP2

v62	[BTC:E1:E1_p:PI3K] + PIP2 <-> [BTC:E1:E1_p: PI3K:PIP2]	kf61	kr61
v63	v63 [BTC:E1:E1:BTC_p: PI3K] + PIP2 <-> [BTC: E1:E1:BTC_p:PI3K: PIP2]	kf61	kr61
v64	[BTC:E1:E2_p:PI3K] + PIP2 <-> [BTC:E1:E2_p: PI3K:PIP2]	kf61	kr61
v65	[BTC:E1:E3_p:PI3K] + PIP2 <-> [BTC:E1:E3_p: PI3K:PIP2]	kf59	kr59
v66	[E2:E3:HRG_p:PI3K: PIP2] -> [E2:E3:HRG_p: PI3K] + PIP3	kf66	
v67	[E1:E3:HRG_p:PI3K: PIP2] -> [E1:E3:HRG_p: PI3K] + PIP3	kf66	
v68	[E2:E2_p:PI3K:PIP2] -> [E2:E2_p:PI3K] + PIP3	kf68	
v69	[BTC:E1:E1_p:PI3K: PIP2] -> [BTC:E1:E1_p: PI3K] + PIP3	kf68	
v70	[BTC:E1:E1:BTC_p: PI3K:PIP2] -> [BTC:E1: E1:BTC_p:PI3K] + PIP3	kf68	
v71	[BTC:E1:E2_p:PI3K: PIP2] -> [BTC:E1:E2_p: PI3K] + PIP3	kf68	
v72	[BTC:E1:E3_p:PI3K: PIP2] -> [BTC:E1:E3_p: PI3K] + PIP3	kf66	

Cascada de activación de AKT

v73	PIP3 + PTEN <-> [PIP3: PTEN]	kf73	kr73
v74	[PIP3:PTEN] -> PIP2 + PTEN	kf74	
v75	PIP3 + AKT <-> [PIP3: AKT]	kf75	kr75
v76	[PIP3:AKT] + PDK1 <-> [PIP3:AKT:PDK1]	kf76	kr76
v77	[PIP3:AKT:PDK1] -> AKT_p + [PIP3:PDK1]	kf77	
v78	[PIP3:PDK1] -> PIP3 + PDK1	kf78	

(continuación)

Cascada de activación de AKT

v79	PIP3 + AKT_p <-> [PIP3:AKT_p]	kf75	kr75
v80	[PIP3:AKT_p] + PDK1 <-> [PIP3:AKT_p:PDK1]	kf76	kr76
v81	[PIP3:AKT_p:PDK1] -> AKT_p_p + [PIP3:PDK1]	kf81	
v82	AKT_p_p + PP2A <-> [AKT_p_p:PP2A]	kf82	kr82
v83	[AKT_p_p:PP2A] -> AKT_p + PP2A	kf83	
v84	AKT_p + PP2A <-> [AKT_p:PP2A]	kf82	kr82
v85	[AKT_p:PP2A] -> AKT + PP2A	kf83	
v86	AKT_p_p + PP2Aoff <-> [AKT_p_p:PP2Aoff]	kf86	kr86
v87	[AKT_p_p:PP2Aoff] -> AKT_p_p + PP2A	kf87	

Internalización

v88	[E3:HRG] <-> [iE3:HRG]	kf88	kr88
v89	[E3:HRG_p] <-> [iE3:HRG_p]	kf88	kr88
v90	E2_p <-> iE2_p	kf88	kr88
v91	[BTC:E1] <-> [iBTC:E1]	kf88	kr88
v92	[BTC:E1_p] <-> [iBTC:E1_p]	kf88	kr88
v93	[E2:E3:HRG] <-> [iE2:E3:HRG]	kf93	kr93
v94	[E2:E3:HRG_p] <-> [iE2:E3:HRG_p]	kf93	kr93
v95	[E2:E3:HRG_p:RTKpase] <-> [iE2:E3:HRG_p:RTKpase]	kf93	kr93
v96	[E2:E3:HRG_p:PI3K] <-> [iE2:E3:HRG_p:PI3K]	kf93	kr93
v97	[E2:E3:HRG_p:PI3K:PIP2] <-> [iE2:E3:HRG_p:PI3K:PIP2]	kf93	kr93
v98	[E1:E3:HRG] <-> [iE1:E3:HRG]	kf98	kr98
v99	[E1:E3:HRG_p] <-> [iE1:E3:HRG_p]	kf98	kr98
v100	[E1:E3:HRG_p:RTKpase] <-> [iE1:E3:HRG_p:RTKpase]	kf98	kr98

(continuación)

Internalización

v101	[E1:E3:HRG_p:PI3K] <-> [iE1:E3:HRG_p:PI3K]	kf98	kr98
v102	[E1:E3:HRG_p:PI3K:PIP2] <-> [iE1:E3:HRG_p:PI3K:PIP2]	kf98	kr98
v103	[E2:E2_p] <-> [iE2:E2_p]	kf93	kr93
v104	[E2:E2_p:RTKpase] <-> [iE2:E2_p:RTKpase]	kf93	kr93
v105	[E2:E2_p:PI3K] <-> [iE2:E2_p:PI3K]	kf93	kr93
v106	[E2:E2_p:PI3K:PIP2] <-> [iE2:E2_p:PI3K:PIP2]	kf93	kr93
v107	[BTC:E1:E1] <-> [iBTC:E1:E1]	kf107	kr107
v108	[BTC:E1:E1:BTC] <-> [iBTC:E1:E1:BTC]	kf107	kr107
v109	[BTC:E1:E1_p] <-> [iBTC:E1:E1_p]	kf107	kr107
v110	[BTC:E1:E1:BTC_p] <-> [iBTC:E1:E1:BTC_p]	kf107	kr107
v111	[BTC:E1:E1_p:RTKpase] <-> [iBTC:E1:E1_p:RTKpase]	kf107	kr107
v112	[BTC:E1:E1:BTC_p:RTKpase] <-> [iBTC:E1:E1:BTC_p:RTKpase]	kf107	kr107
v113	[BTC:E1:E1_p:PI3K] <-> [iBTC:E1:E1_p:PI3K]	kf107	kr107
v114	[BTC:E1:E1:BTC_p:PI3K] <-> [iBTC:E1:E1:BTC_p:PI3K]	kf107	kr107
v115	[BTC:E1:E1_p:PI3K:PIP2] <-> [iBTC:E1:E1_p:PI3K:PIP2]	kf107	kr107
v116	[BTC:E1:E1:BTC_p:PI3K:PIP2] <-> [iBTC:E1:E1:BTC_p:PI3K:PIP2]	kf107	kr107
v117	[BTC:E1:E2] <-> [iBTC:E1:E2]	kf117	kr117
v118	[BTC:E1:E2_p] <-> [iBTC:E1:E2_p]	kf117	kr117
v119	[BTC:E1:E2_p:RTKpase] <-> [iBTC:E1:E2_p:RTKpase]	kf117	kr117
v120	[BTC:E1:E2_p:PI3K] <-> [iBTC:E1:E2_p:PI3K]	kf117	kr117

(continuación)

Internalización

v121	[BTC:E1:E2_p:PI3K: PIP2] <-> [iBTC:E1:E2_p: PI3K:PIP2]	kf117	kr117
v122	[BTC:E1:E3] <-> [iBTC: E1:E3]	kf117	kr117
v123	[BTC:E1:E3_p] <-> [iBTC: E1:E3_p]	kf117	kr117
v124	[BTC:E1:E3_p:RTKpase] <-> [iBTC:E1:E3_p: RTKpase]	kf117	kr117
v125	[BTC:E1:E3_p:PI3K] <-> [iBTC:E1:E3_p:PI3K]	kf117	kr117
v126	[BTC:E1:E3_p:PI3K: PIP2] <-> [iBTC:E1:E3_p: PI3K:PIP2]	kf117	kr117

Unión de ligando endosomal

v127	iHRG + iE3 <-> [iE3:HRG]	kf127	kr1
v128	iHRG + [iE2:E3] <-> [iE2: E3:HRG]	kf127	kr1
v129	iBTC + iE1 <-> [iBTC:E1]	kf129	kr3
v130	iBTC + [iE1:E1] <-> [iBTC: E1:E1]	kf129	kr3
v131	iBTC + [iE1:E2] <-> [iBTC: E1:E2]	kf129	kr3
v132	iBTC + [iE1:E3] <-> [iBTC: E1:E3]	kf129	kr3

Dimerización endosomal

v133	[iE3:HRG] + iE2 <-> [iE2: E3:HRG]	kf7	kr7
v134	[iE3:HRG_p] + iE2_p <-> [iE2:E3:HRG_p]	kf7	kr7
v135	[iE3:HRG_p] + iE2 -> [iE2: E3:HRG_p]	kf7	
v136	[iE3:HRG] + iE1 <-> [iE1: E3:HRG]	kf10	kr7
v137	[iE3:HRG_p] + iE1 <-> [iE1:E3:HRG_p]	kf10	kr7
v138	iE2_p + iE2 -> [iE2:E2_p]	kf12	
v139	iE2_p + iE2_p <-> [iE2: E2_p]	kf12	kr12
v140	[iBTC:E1] + iE1 <-> [iBTC: E1:E1]	kf14	kr14

(continuación)

Dimerización endosomal

v141	[iBTC:E1_p] + iE1 <-> [iBTC:E1:E1_p]	kf14	kr14
v142	[iBTC:E1] + [iBTC:E1] <-> [iBTC:E1:E1:BTC]	kf16	kr16
v143	[iBTC:E1_p] + [iBTC:E1] <-> [iBTC:E1:E1:BTC_p]	kf16	kr16
v144	[iBTC:E1_p] + [iBTC: E1_p] <-> [iBTC:E1:E1: BTC_p]	kf16	kr16
v145	[iBTC:E1] + iE2 <-> [iBTC: E1:E2]	kf19	kr19
v146	[iBTC:E1_p] + iE2 -> [iBTC:E1:E2_p]	kf19	
v147	[iBTC:E1] + iE2_p -> [iBTC:E1:E2_p]	kf19	
v148	[iBTC:E1_p] + iE2_p <-> [iBTC:E1:E2_p]	kf19	kr19
v149	[iBTC:E1] + iE3 <-> [iBTC: E1:E3]	kf23	kr19
v150	[iBTC:E1_p] + iE3 <-> [iBTC:E1:E3_p]	kf23	kr19
v151	iE3 + iE2 <-> [iE2:E3]	kf12	kr12
v152	iE3 + iE1 <-> [iE1:E3]	kf12	kr12
v153	iE1 + iE2 <-> [iE1:E2]	kf12	kr12
v154	iE1 + iE1 <-> [iE1:E1]	kf12	kr12
v155	iE2 + iE2 <-> [iE2:E2]	kf12	kr12
Fosforilación y desfosforilación endosomal			
v156	[iE2:E3:HRG] -> [iE2:E3: HRG_p]	kf30	
v157	[iE1:E3:HRG] -> [iE1:E3: HRG_p]	kf30	
v158	[iBTC:E1:E1] -> [iBTC:E1: E1_p]	kf30	
v159	[iBTC:E1:E1:BTC] -> [iBTC:E1:E1:BTC_p]	kf30	
v160	[iBTC:E1:E2] -> [iBTC:E1: E2_p]	kf30	
v161	[iBTC:E1:E3] -> [iBTC:E1: E3_p]	kf30	
v162	[iE3:HRG_p] -> iHRG + iE3	kr1	
v163	[iBTC:E1_p] -> iBTC + iE1	kr3	

(continuación)

Fosforilación y desfosforilación endosomal

v164	[iE2:E3:HRG_p] + RTKpase <-> [iE2:E3: HRG_p:RTKpase]	kf38	kr38
v165	[iE1:E3:HRG_p] + RTKpase <-> [iE1:E3: HRG_p:RTKpase]	kf38	kr38
v166	[iE2:E2_p] + RTKpase <- > [iE2:E2_p:RTKpase]	kf38	kr38
v167	[iBTC:E1:E1_p] + RTKpase <-> [iBTC:E1: E1_p:RTKpase]	kf38	kr38
v168	[iBTC:E1:E1:BTC_p] + RTKpase <-> [iBTC:E1: E1:BTC_p:RTKpase]	kf38	kr38
v169	[iBTC:E1:E2_p] + RTKpase <-> [iBTC:E1: E2_p:RTKpase]	kf38	kr38
v170	[iBTC:E1:E3_p] + RTKpase <-> [iBTC:E1: E3_p:RTKpase]	kf38	kr38
v171	[iE2:E3:HRG_p: RTKpase] -> [iE2:E3: HRG] + RTKpase	kf45	
v172	[iE1:E3:HRG_p: RTKpase] -> [iE1:E3: HRG] + RTKpase	kf45	
v173	[iE2:E2_p:RTKpase] -> [iE2:E2] + RTKpase	kf45	
v174	[iBTC:E1:E1_p: RTKpase] -> [iBTC:E1: E1] + RTKpase	kf45	
v175	[iBTC:E1:E1:BTC_p: RTKpase] -> [iBTC:E1: E1:BTC] + RTKpase	kf45	
v176	[iBTC:E1:E2_p: RTKpase] -> [iBTC:E1: E2] + RTKpase	kf45	
v177	[iBTC:E1:E3_p: RTKpase] -> [iBTC:E1: E3] + RTKpase	kf45	
Unión de PI3K endosomal			
v178	[iE2:E3:HRG_p] + PI3K <- > [iE2:E3:HRG_p:PI3K]	kf52	kr52
v179	[iE1:E3:HRG_p] + PI3K <- > [iE1:E3:HRG_p:PI3K]	kf52	kr52
v180	[iE2:E2_p] + PI3K <-> [iE2:E2_p:PI3K]	kf54	kr54

(continuación)

Unión de PI3K endosomal

v181	[iBTC:E1:E1_p] + PI3K <-> > [iBTC:E1:E1_p:PI3K]	kf54	kr54
v182	[iBTC:E1:E1:BTC_p] + PI3K <-> [iBTC:E1:E1: BTC_p:PI3K]	kf54	kr54
v183	[iBTC:E1:E2_p] + PI3K <-> > [iBTC:E1:E2_p:PI3K]	kf54	kr54
v184	[iBTC:E1:E3_p] + PI3K <-> > [iBTC:E1:E3_p:PI3K]	kf52	kr52
Degradación			
v185	iHRG -> dHRG	kf185	
v186	iBTC -> dBTC	kf185	
v187	[iE3:HRG] -> [dE3:HRG]	kf187	
v188	[iBTC:E1] -> [dBTC:E1]	kf187	
v189	[iE3:HRG_p] -> [dE3: HRG_p]	kf187	
v190	[iBTC:E1_p] -> [dBTC: E1_p]	kf187	
v191	iE2_p -> dE2_p	kf187	
v192	[iE2:E3:HRG] -> [dE2:E3: HRG]	kf192	
v193	[iE2:E3:HRG_p] -> [dE2: E3:HRG_p]	kf192	
v194	[iE2:E3:HRG_p: RTKpase] -> [dE2:E3: HRG_p:RTKpase]	kf192	
v195	[iE2:E3:HRG_p:PI3K] -> [dE2:E3:HRG_p:PI3K]	kf192	
v196	[iE2:E3:HRG_p:PI3K: PIP2] -> [dE2:E3:HRG_p: PI3K:PIP2]	kf192	
v197	[iE2:E2_p] -> [dE2:E2_p]	kf192	
v198	[iE2:E2_p:RTKpase] -> [dE2:E2_p:RTKpase]	kf192	
v199	[iE2:E2_p:PI3K] -> [dE2: E2_p:PI3K]	kf192	
v200	[iE2:E2_p:PI3K:PIP2] -> [dE2:E2_p:PI3K:PIP2]	kf192	
v201	[iE1:E3:HRG] -> [dE1:E3: HRG]	kf201	
v202	[iE1:E3:HRG_p] -> [dE1: E3:HRG_p]	kf201	

(continuación)

Degradación

v203	[iE1:E3:HRG_p: RTKpase] -> [dE1:E3: HRG_p:RTKpase]	kf201
v204	[iE1:E3:HRG_p:PI3K] -> [dE1:E3:HRG_p:PI3K]	kf201
v205	[iE1:E3:HRG_p:PI3K: PIP2] -> [dE1:E3:HRG_p: PI3K:PIP2]	kf201
v206	[iBTC:E1:E1] -> [dBTC: E1:E1]	kf206
v207	[iBTC:E1:E1_p] -> [dBTC: E1:E1_p]	kf206
v208	[iBTC:E1:E1_p: RTKpase] -> [dBTC:E1: E1_p:RTKpase]	kf206
v209	[iBTC:E1:E1_p:PI3K] -> [dBTC:E1:E1_p:PI3K]	kf206
v210	[iBTC:E1:E1_p:PI3K: PIP2] -> [dBTC:E1:E1_p: PI3K:PIP2]	kf206
v211	[iBTC:E1:E1:BTC] -> [dBTC:E1:E1:BTC]	kf206
v212	[iBTC:E1:E1:BTC_p] -> [dBTC:E1:E1:BTC_p]	kf206
v213	[iBTC:E1:E1:BTC_p: RTKpase] -> [dBTC:E1: E1:BTC_p:RTKpase]	kf206
v214	[iBTC:E1:E1:BTC_p: PI3K] -> [dBTC:E1:E1: BTC_p:PI3K]	kf206
v215	[iBTC:E1:E1:BTC_p: PI3K:PIP2] -> [dBTC:E1: E1:BTC_p:PI3K:PIP2]	kf206
v216	[iBTC:E1:E2] -> [dBTC: E1:E2]	kf201
v217	[iBTC:E1:E2_p] -> [dBTC: E1:E2_p]	kf201
v218	[iBTC:E1:E2_p: RTKpase] -> [dBTC:E1: E2_p:RTKpase]	kf201
v219	[iBTC:E1:E2_p:PI3K] -> [dBTC:E1:E2_p:PI3K]	kf201
v220	[iBTC:E1:E2_p:PI3K: PIP2] -> [dBTC:E1:E2_p: PI3K:PIP2]	kf201
v221	[iBTC:E1:E3] -> [dBTC: E1:E3]	kf201

(continuación)

Degradación

v222	[iBTC:E1:E3_p] -> [dBTC:E1:E3_p]	kf201
v223	[iBTC:E1:E3_p:RTKpase] -> [dBTC:E1:E3_p:RTKpase]	kf201
v224	[iBTC:E1:E3_p:PI3K] -> [dBTC:E1:E3_p:PI3K]	kf201
v225	[iBTC:E1:E3_p:PI3K:PIP2] -> [dBTC:E1:E3_p:PI3K:PIP2]	kf201

Tabla 10: descripción de parámetros con valores. El número de parámetro corresponde a la primera reacción en la cual aparece ese parámetro

Nombre	Valor	Unidades	Descripción
Av	$6,0 \times 10^{23}$		Número de Avogadro
Vmedia	$1,00 \times 10^{-04}$	litros	Volumen medio por pocillo
Vcell	$1,00 \times 10^{-12}$	litros	Volumen celular
Num cells	30000		Número de células por pocillo
kf1	$5,00 \times 10^{-11}$	moléculas-1 s-1	Unión de HRG a E3 o E4. Conversión de unidad calculada como $1e5M^{-1}s^{-1} / (Vmedia \cdot Av / Num_cells)$.
kr1	0,001	s-1	Disociación de HRG de E3
kf2	$5,00 \times 10^{-11}$	moléculas-1 s-1	Unión de HRG a dímeros E3:E2
kr2	0,001	s-1	Disociación de HRG de dímeros E3:E2
kf3	$5,00 \times 10^{-11}$	moléculas-1 s-1	Unión de BTC a E1
kr3	0,001	s-1	Disociación de BTC de E1
kf4	$5,00 \times 10^{-11}$	moléculas-1 s-1	Unión de BTC a homodímeros E1
kf5	$5,00 \times 10^{-11}$	moléculas-1 s-1	Unión de BTC a heterodímeros E1
kf7	$3,00 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Dimerización de E2 a HRG:E3
kr7	0,001	s-1	Disociación de E2 a HRG:E3
kf10	$3,00 \times 10^{-08}$	moléculas-1 s-1	Dimerización de E1 a HRG:E3
kf12	$4,20 \times 10^{-09}$	moléculas-1 s-1	Dimerización - constitutiva y sin ligando
kr12	0,001	s-1	Disociación - constitutiva y sin ligando
kf14	$1,70 \times 10^{-05}$	moléculas-1 s-1	Dimerización de E1 a BTC:E1

Nombre	Valor	Unidades	Descripción
kr14	0,001	s-1	Disociación de E1 a BTC:E1
kf16	$1,70 \times 10^{-05}$	moléculas-1 s-1	Dimerización de BTC:E1 a BTC:E1
kr16	0,001	s-1	Disociación de BTC:E1 a BTC:E1
kf19	$3,30 \times 10^{-05}$	moléculas-1 s-1	Dimerización de E2 a BTC:E1
kr19	0,001	s-1	Disociación de E2 o E3 a BTC:E1
kf23	$4,70 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Dimerización de E3 a BTC:E1
kf30	1	s-1	Velocidad de autofosforilación enzimática de dímeros unidos a ligando
kf38	$5,00 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Unión de fosfatasa a receptor
kr38	0,1	s-1	Disociación de fosfatasa a receptor
kf45	1	s-1	Velocidad enzimática para desfosforilación de receptor
kf52	$3,00 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Unión de PI3K a dímeros que contienen E3
kr52	0,1	s-1	Disociación de PI3K de dímeros que contienen E3
kf54	$7,50 \times 10^{-07}$	moléculas-1 s-1	Unión de PI3K a dímeros que no contienen E3
kr54	0,1	s-1	Disociación de PI3K de dímeros que no contienen E3
kf59	$5,00 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Unión de PIP2 a heterodímeros que contienen E3
kr59	0,1	s-1	Disociación de PIP2 de heterodímeros que contienen E3
kf61	$5,00 \times 10^{-07}$	moléculas-1 s-1	Unión de PIP2 a heterodímeros que no contienen E3
kr61	0,1	s-1	Disociación de PIP2 de heterodímeros que no contienen E3
kf66	0,2	s-1	Velocidad de activación de PIP3 por dímeros que contienen E3
kf68	0,013	s-1	Velocidad de activación de PIP3 por dímeros que no contienen E3
kf73	$5,00 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Unión de PIP3 a PTEN
kr73	0,1	s-1	Disociación de PIP3 de PTEN

Nombre	Valor	Unidades	Descripción
kf74	0,1	s-1	Inactivación de PIP3 por PTEN
kf75	$2,60 \times 10^{-04}$	moléculas-1 s-1	Unión de PIP3 a Akt o Akt p
kr75	0,1	s-1	Disociación de PIP3 de Akt o Akt p
kf76	$6,70 \times 10^{-05}$	moléculas-1 s-1	Unión de PDK1 a PIP3:Akt
kr76	0,1	s-1	Disociación de PDK1 de PIP3:Akt
kf77	1	s-1	Velocidad de fosforilación enzimática para Akt
kf78	0,2	s-1	Disociación de PDK1 de PIP3
kf81	1	s-1	Velocidad de fosforilación enzimática para Akt_p
kf82	$1,70 \times 10^{-06}$	moléculas-1 s-1	Unión de PP2A a Akt fosforilado
kr82	0,1	s-1	Disociación de PP2A de Akt fosforilado
kf83	1,5	s-1	Desfosforilación y disociación de Akt
kf86	$8,30 \times 10^{-09}$	moléculas-1 s-1	Unión de AKT_p_p a PP2Aoff
kr86	0,5	s-1	Disociación de AKT_p_p de PP2Aoff
kf87	0,1	s-1	Activación de PP2Aoff por AKT_p_p
kf88	0,1	s-1	Velocidad de internalización para monómeros unidos a ligando o activos
kr88	0,005	s-1	Velocidad de reciclaje de monómeros unidos a ligando o activos
kf93	0,005	s-1	Velocidad de internalización para heterodímeros E2:E3 y homodímeros E2 unidos a HRG
kr93	0,005	s-1	Velocidad de reciclaje para heterodímeros E2:E3 y homodímeros E2 unidos a HRG
kf98	0,005	s-1	Velocidad de internalización para heterodímeros E1:E3 unidos a HRG
kr98	0,005	s-1	Velocidad de reciclaje para heterodímeros E1:E3 unidos a HRG
kf107	0,1	s-1	Velocidad de internalización para homodímeros E1 unidos a BTC

Nombre	Valor	Unidades	Descripción
kr107	0,005	s-1	Velocidad de reciclaje para homodímeros E1 unidos a BTC
kf117	0,1	s-1	Velocidad de internalización para heterodímeros E1 unidos a BTC
kr117	0,005	s-1	Velocidad de reciclaje para heterodímeros unidos a BTC que contienen E1
kf127	3,8	moléculas-1 s-1	Unión de HRG en el endosoma
kf129	3,8	moléculas-1 s-1	Unión de BTC en el endosoma
kf185	0,002	s-1	Velocidad de degradación de ligando
kf187	0,002	s-1	Velocidad de degradación de monómeros unidos a ligando
kf192	0,002	s-1	Velocidad de degradación de homo o heterodímeros unidos a ligando que contienen E2
kf201	0,002	s-1	Velocidad de degradación de heterodímeros unidos a ligando que contienen E1
kf206	0,002	s-1	Degradación de homodímeros E1 unidos a ligando

Tabla 11: Parámetros sensibles de ErbB3, ErbB2, ErbB1 y AKT
Sensibilidad de pErbB3 durante estimulación con Heregulina **Sensibilidad de pErbB3 durante estimulación con Betacelulina**

kf1	4799	kf5	3824
kr93	2163	kf23	2353
kf7	1902	kf3	1821
kr88	1277	kf12	1389
kr12	1192	kr12	-1343
kf12	-1111	kf14	-1742
kf187	-1136	kf14	-6462
kf88	-1907		
kf93	-3122		
kf192	-4452		
Sensibilidad de pErbB2 durante		Sensibilidad de pErbB2 durante estimulación con Betacelulina	
kf1	4747	kf3	3878
kr93	2245	kf19	3124
kf7	2136	kf5	1060
kr88	1267	kf14	-2768
kr12	1155	kf14	-6515
kf12	-1071		

kf187	-1137		
kf88	-1892		
kf93	-3239		
kf192	-4617		
Sensibilidad de pErbB1 durante estimulación con Heregulina		Sensibilidad de pErbB1 durante estimulación con Betacelulina	
kf10	6990	kf3	2847
kf1	6222	kf4	1044
kr12	2224	kf14	-1665
kr98	2174	kf206	-4983
kr88	1616		
kf187	-1423		
kf12	-2189		
kf88	-2414		
kf98	-3155		
kf14	-4457		
kf7	-4469		
Sensibilidad de pAKT durante estimulación con Heregulina		Sensibilidad de pAKT durante estimulación con Betacelulina	
kf66	6657	kf75	5462
kf75	5418	kf66	5395
kf1	4799	kr117	4420
kr93	3937	kf5	3250
kr73	2705	kr86	2854
kf7	2022	kr73	2726
kr86	1918	kf3	2351
kf78	1584	kf68	1815
kr88	1209	k23	1804
kr12	1127	kf78	1750
kf12	-1044	kr107	1024

Tabla 12: Esquema de implementación para Ab N° 6, cetuximab, pertuzumab y lapatinib.

Número de reacción	Reacción	Parámetro directo	Parámetro inverso
Implementación de Ab N° 6			
Ab N° 6_v1	Ab N° 6 + E3 <-> [E3:Ab N° 6]	kfAb N° 6_1	krAb N° 6_1
Ab N° 6_v2	[E3:Ab N° 6] + E3 <-> [E3:Ab N° 6:E3]	kfAb N° 6_2	krAb N° 6_2
Ab N° 6_v3	[E3:Ab N° 6:E3] <-> [iE3:Ab N° 6:E3]	kfAb N° 6_3	krAb N° 6_3
Ab N° 6_v4	[iE3:Ab N° 6:E3] <-> [dE3:Ab N° 6:E3]	kfAb N° 6_4	
Implementación de cetuximab			
Cetuximab_v1	Cetuximab + E1 <-> [E1:Cetuximab]	kfCetuximab_1	krCetuximab_1

Número de reacción	Reacción	Parámetro directo	Parámetro inverso
Cetuximab_v2	[E1:Cetuximab] + E1 <-> [E1:Cetuximab:E1]	kfCetuximab_2	krCetuximab_2
Implementación de Pertuzumab			
Pertuzumab_v1	[Pertuzumab] + E2 <-> [E2:Pertuzumab]	kfPertuzumab_1	krPertuzumab_1
Pertuzumab_v2	[E2:Pertuzumab] + E2 <-> [E2:Pertuzumab: E2]	kfPertuzumab_2	krPertuzumab_2
Implementación de Lapatinib			
Lapatinib_v1	Lapatinib +E1 <-> [Lapatinib:E1]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v2	Lapatinib + E2 <-> [Lapatinib:E2]	kfLapatinib_2	krLapatinib_2
Lapatinib_v3	Lapatinib + [E1:E1] <-> [Lapatinib:E1:E1]	kfLapatinib_3	krLapatinib_1
Lapatinib_v4	Lapatinib + [E1:E2] <-> [Lapatinib:E1:E2]	kfLapatinib_3	krLapatinib_1
Lapatinib_v5	Lapatinib + [E1:E3] <-> [Lapatinib:E1:E3]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v6	Lapatinib + [E2:E2] <-> [Lapatinib:E2:E2]	kfLapatinib_4	krLapatinib_2
Lapatinib_v7	Lapatinib + [E2:E3] <-> [Lapatinib:E2:E3]	kfLapatinib_2	krLapatinib_2
Lapatinib_v 8	Lapatinib + [Lapatinib:E1:E1] <-> [Lapatinib: E1:E1:Lapatinib]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 9	Lapatinib + [Lapatinib:E1:E2] <-> [Lapatinib: E1:E2:Lapatinib]	kfLapatinib_1	kriapatinib_1
Lapatinib_v 10	Lapatinib + [Lapatinib:E2:E2] <-> [Lapatinib: E2:E2:Lapatinib]	kfLapatinib_2	krLapatinib_2
Lapatinib_v 11	Lapatinib + [BTC:E1] <-> [Lapatinib:BTC:E1]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 12	Lapatinib + [BTC:E1:E1] <-> [Lapatinib:BTC: E1:E1]	kfLapatinib_3	krLapatinib_1
Lapatinib_v 13	Lapatinib +[BTC:E1:E1:BTC] <-> [Lapatinib: BTC:E1:E1:BTC]	kfLapatinib_3	krLapatinib_1
Lapatinib_v 14	Lapatinib + [BTC:E1:E2] <-> [Lapatinib:BTC: E1:E2]	kfLapatinib_3	krLapatinib_1
Lapatinib_v 15	Lapatinib + [BTC:E1:E3] <-> [Lapatinib:BTC: E1:E3]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 16	Lapatinib + [E2:E3:HRG] <-> [Lapatinib:E2: E3:HRG]	kfLapatinib_2	krLapatinib_2
Lapatinib_v 17	Lapatinib + [E1:E3:HRG] <-> [Lapatinib:E1: E3:HRG]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 18	Lapatinib + [Lapatinib:BTC:E1:E1] <-> [Lapatinib:BTC:E1:E1:Lapatinib]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 19	Lapatinib + [Lapatinib:BTC:E1:E1:BTC] <-> [Lapatinib:BTC:E1:E1:BTC:Lapatinib]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 20	Lapatinib + [Lapatinib:BTC:E1:E2] <-> [Lapatinib:BTC:E1:E2:Lapatinib]	kfLapatinib_1	krLapatinib_1
Lapatinib_v 21	[Lapatinib:E1] +E1 <-> [Lapatinib:E1:E1]	kf12	kr12
Lapatinib_v22	[Lapatinib:E1] + E2 <-> [Lapatinib:E1:E2]	kf 12	kr12

Número de reacción	Reacción	Parámetro directo	Parámetro inverso
Lapatinib_v23	[Lapatinib:E1] + E3 <-> [Lapatinib:E1:E3]	kf12	kr12
Lapatinib_v24	[Lapatinib:E2] + E1 <-> [Lapatinib:E1:E2]	kf 12	kr12
Lapatinib_v25	[Lapatinib:E2] + E3 <-> [Lapatinib:E2:E3]	kf 12	kr12
Lapatinib_v 26	[Lapatinib:E1] + [Lapatinib:E1] <-> [Lapatinib: E1:E1:Lapatinib]	kf 12	kr12
Lapatinib_v 27	[Lapatinib:E1] + [Lapatinib:E2] <-> [Lapatinib: E1:E2:Lapatinib]	kf 12	kr12
Lapatinib_v 28	[Lapatinib:E2] + [Lapatinib:E2] <-> [Lapatinib: E2:E2:Lapatinib]	kf 12	kr12
Lapatinib_v 29	[Lapatinib:BTC:E1]+E1 <-> [Lapatinib:BTC: E1:E1]	kf14	kr14
Lapatinib_v 30	[Lapatinib:BTC:E1 + E2 <-> [Lapatinib:BTC: E1:E2]	kf19	kr19
Lapatinib_v 31	[Lapatinib:BTC:E1] + E3 <-> [Lapatinib:BTC: E1:E3]	kf23	kr19
Lapatinib_v 32	[Lapatinib:BTC:E1 + [BTC:E1] <-> [Lapatinib: BTC:E1:E1:BTC]	kf16	kr16
Lapatinib_v 33	[Lapatinib:BTC:E1] + [Lapatinib:BTC:E1 <-> > [Lapatinib:BTC:E1:E1:BTC:Lapatinib]	kf16	kr16
Lapatinib_v 34	[Lapatinib:BTC:E1] + [Lapatinib:E2] <-> [Lapatinib:BTC:E1:E2:Lapatinib]	kf19	kr19
Lapatinib_v 35	[Lapatinib:E2] + [HRG:E3] <-> [Lapatinib:E2: E3:HRG]	kf7	kr7
Lapatinib_v 36	[Lapatinib:E1] + [HRG:E3] <-> [Lapatinib:E1: E3:HRG]	kf 10	kr7
Lapatinib_v	[Lapatinib:E1] + BTC <-> [Lapatinib:BTC:E1]	kf3	kr3
Lapatinib_v 38	[Lapatinib:E1:E1] + BTC <-> [Lapatinib:BTC: E1:E1]	kf4	kr3
Lapatinib_v 39	[Lapatinib:E1:E2] + BTC <-> [Lapatinib:BTC: E1:E2]	kf5	kr3
Lapatinib_v 40	[Lapatinib:E1:E3] + BTC <-> [Lapatinib:BTC: E1:E3]	kf5	kr3
Lapatinib_v 41	[Lapatinib:BTC:E1:E1] + BTC <-> [Lapatinib: BTC:E1:E1:BTC]	kf4	kr4
Lapatinib_v 42	[Lapatinib:E2:E3] + HRG <-> [Lapatinib:E2: E3:HRG]	kf2	kr1

Tabla 13: Valores de parámetro de inhibidor

Nombre	Valor	Unidades	Descripción
Vcell	1,0E-12	litros	Volumen celular.
Vshell	4,8E-15	litros	Volumen reducido de Vshell para 2º brazo de unión de IgG. $V_{shell} = 4/3 \cdot \pi \cdot ((Cell_radius + Cell_shellheight)^3 - cell-radius)$ Radio celular $(V_{ce} \cdot H^3 / (4 \cdot \pi))^{1/3}$ en decímetros. Altura de envuelta celular = 1e-7 decímetros. La altura de envuelta celular representa la distancia promedio entre los sitios de unión de anticuerpo.

Parámetros de MM-121

Nombre	Valor	Unidades	Descripción
kf Ab N° 6_1	7,15E-11	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor Ab N° 6 a ErbB3. Conversión de unidades calculada como $1,43e5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / (V_{media} * A_v / \text{Num_cells})$. Número de células = 30.000 por pocillo.
kr Ab N° 6_1	1,10E-04	s ⁻¹	Disociación de inhibidor Ab N° 6 de ErbB3
kf Ab N° 6_2	4,96E-05	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor Ab N° 6 a un segundo ErbB3. Aidez debida a reducción de volumen = $kr \text{ Ab N° 6_1} * (V_{media} / \text{Numcells}) / A_{shell}$.
kr Ab N° 6_2	2,20E-04	s ⁻¹	Disociación de inhibidor Ab N° 6 a partir de un segundo ErbB3 ($2 * k_{rmm121_1}$)
kf Ab N° 6_3	5,56E-04	s ⁻¹	Velocidad de internalización para Ab N° 6 unido a dos moléculas de ErbB3
kr Ab N° 6_3	5,00E-03	s ⁻¹	Velocidad de reciclaje para Ab N° 6 unido a dos moléculas de ErbB3
kf Ab N° 6_4	2,00E-04	s ⁻¹	Degradación de especies unidas a Ab N° 6
Parámetros de cetuximab			
kfCetuximab _1	1,10E-10	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor cetuximab a ErbB1. Conversión de unidades calculada como $2,2e5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / (V_{media} * A_v / \text{Num_cells})$.
krCetuximab _1	1,10E-03	s ⁻¹	Disociación de inhibidor cetuximab de ErbB1
kfCetuximab _2	7,64E-05	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor cetuximab a un segundo ErbB1. Aidez debida a reducción de volumen = $krCetuximab_1 * (V_{media} / \text{Numcells}) / V_{shell}$.
krCetuximab _2	2,20E-03	s ⁻¹	Disociación de inhibidor cetuximab cuando se une a dos moléculas de ErbB1 ($2 * k_{rcetuximab_1}$)
Parámetros de Pertuzumab			
Pertuzumab _1	5,60E-11	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor pertuzumab a ErbB2. Conversión de unidades calculada como $1,12e5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / (V_{media} * A_v / \text{Num_cells})$.
krPertuzumab _1	9,50E-04	s ⁻¹	Disociación de inhibidor pertuzumab de ErbB2
kfPertuzumab _2	3,90E-05	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor pertuzumab a un segundo ErbB2. Aidez debida a reducción de volumen = $krPertuzumab_1 * (V_{media} / \text{Numcells}) / V_{shell}$.
krPertuzumab _2	1,90E-03	s ⁻¹	Disociación de inhibidor pertuzumab de un segundo ErbB2 ($2 * k_{rpertuzumab_1}$).
Parámetros de Lapatinib			
kfLapatinib _1	6,40E-12	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor Lapatinib a ErbB1 o dímeros 1-3. Conversión de unidades calculada como $1,28e4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / (V_{media} * A_v / \text{Num_cells})$.
krLapatinib _1	3,83E-05	s ⁻¹	Disociación de inhibidor Lapatinib de ErbB1 o dímeros 1-3
kfLapatinib _2	1,50E-12	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor Lapatinib a ErbB2 o dímeros 2-3. Conversión de unidades calculada como $2,95e3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} / (V_{media} * A_v / \text{Num_cells})$.
krLapatinib _2	3,83E-05	s ⁻¹	Disociación de inhibidor Lapatinib de ErbB2 o dímeros 2-3.
kfLapatinib _3	1,28E-11	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor Lapatinib a dímeros 1-1 o 1-2
kfLapatinib _4	3,00E-12	moléculas ⁻¹ s ⁻¹	Unión de inhibidor Lapatinib a dímeros 2-2

Ejemplo 5: Selección de marcadores predictivos de activación de pErbB3

En este ejemplo, se identificó un conjunto de marcadores de proteína que son predictivos de activación de ErbB23, como se indica por pErbB3 usando el modelo computacional mecanicista de la ruta de señalización de ErbB que se describió en el Ejemplo 4.

Como se demostró que el nivel de fosforilación de ErbB3 en el Ejemplo 2 estaba correlacionado con el índice de respuesta tumoral, se llevó a cabo un análisis de sensibilidad en el modelo computacional entrenado para identificar las proteínas clave que determinan el nivel de fosforilación de ErbB3.

En este análisis de sensibilidad local, las células se estimularon virtualmente *in silico* con HRG o BTC 0,4 nM, los cuales son ambos ligandos que activan la ruta de señalización de ErbB. La sensibilidad de pErbB3 con respecto a los siguientes receptores celulares, quinasas y otras proteínas se determinó: ErbB3, ErbB2, ErbB1, PI3K, PIP2, PTEN, PDK1, PP2A, AKT, RTKpasa y los ligandos (BTC y HRG).

El análisis de sensibilidad local es una herramienta matemática que mide los cambios en un resultado como respuesta a cambios en concentraciones de proteína y parámetros cinéticos dentro de la ruta. La sensibilidad completamente normalizada ($s_{ij}(t)$) de la j^{th} observable $c_i(t)$ con respecto a un cambio en la constante de velocidad j^{th} (k_j) viene dada por la siguiente ecuación:

$$s_{ij}(t) \equiv \frac{\partial \ln(c_i(t))}{\partial \ln(k_j)} \quad (\text{Ec. 2})$$

Posteriormente se llevó a cabo la calibración del modelo usando métodos de optimización locales y globales (Algoritmos Genéticos, hibridación simulada, optimización de Levenberg-Marquardt) que minimizaron la distancia entre los datos experimentales y los resultados de simulación mediante la variación de los parámetros y las concentraciones de proteína iniciales identificadas en el análisis de sensibilidad.

Los resultados de los análisis de sensibilidad local se resumen en el gráfico de barras de la Figura 6. Los resultados indicaron que las siguientes cinco proteínas son el conjunto clave de marcadores que son predictivos de activación de ErbB3 (por ejemplo, formación de pErbB3): ErbB1, ErbB2, ErbB3, HRG y BTC.

Ejemplo 6: Uso de un modelo computacional mecanicista para calcular niveles de pErbB3

En base a los resultados obtenidos en el Ejemplo 5, en los cuales ErbB1, ErbB2, ErbB3, HRG y BTC se identificaron como los marcadores clave de predicción de pErbB3 usando el modelo computacional, se usaron las mediciones de los niveles de expresión de proteína representados en la Tabla 2 como entradas en el modelo computacional para calcular los niveles de pErbB3 para diferentes líneas de células tumorales.

La entrada de los niveles de expresión de BTC y HRG en el modelo computacional requirió la conversión de unidades sin dimensiones o pg/μg en una concentración [M]. Por tanto, era necesario establecer los factores de conversión. Los factores de conversión que convirtieron los niveles de ARNm de HRG y los niveles de expresión de proteína de BTC en una concentración molar se extrapolaron en el rango lineal entre niveles de pErbB3 medidos experimentalmente y predichos. Para los valores medidos experimentalmente, se midieron los niveles de fosforilación de ErbB3 constitutivo (pg/μg) en las cuatro líneas celulares (MALME3M, DU145, ADRr y ACHN) en suero fetal bovino al 10 % (FBS). Estos resultados medidos experimentalmente se muestran en el Ejemplo 4 en la Tabla 2, columna 7. Para el entrenamiento del factor de conversión de ligando, la señal de pErbB3 predicha normalizada integrada a lo largo del tiempo se representó frente al pErbB3 medido experimentalmente en FBS al 10% *in vitro*, usando un factor de conversión de BTC de 6,1 e-005 y un factor de conversión de ARNm de HRG de 3,1e-013. Los factores de conversión de ligando se entrenaron optimizando la relación lineal entre los niveles de pErbB3 predicho y de pErbB3 constitutivo medido (mediante ELISA) en las líneas celulares ADRr, MALME3M, ACHN y DU145.

Por tanto, la activación de la ruta mediante HRG y BTC se simuló usando el modelo y el Estado de Activación de Red (NAS), como se ha indicado por los niveles de pErbB3 calculados, se obtuvo como el resultado. En este caso, el NAS se definió como la cantidad de pErbB3 integrado en el tiempo simulada en el modelo a lo largo de las primeras dos horas de estimulación mediante HRG y BTC. Los resultados para los niveles de pErbB3 calculados se muestran en el gráfico de la Figura 7. El NAS simulado para células ADRr se estableció inicialmente como el umbral entre respondedoras y no respondedoras a tratamiento con Ab N° 6, ya que de las cuatro líneas celulares ensayadas en los modelos de xenoinjerto, la línea de células ADRr fue no respondedora con el nivel de pErbB3 más elevado.

Ejemplo 7: Establecimiento de valores de umbral de NAS usando respuestas de xenoinjerto y sensibilidad predicha en base a umbrales de NAS

En este ejemplo, las respuestas de xenoinjerto para las cuatro líneas de células tumorales descritas en el Ejemplo 1 se combinaron con los valores de NAS (niveles de pErbB3 normalizados integrados en el tiempo) calculados como se ha descrito en el Ejemplo 6 para establecer valores de umbral de NAS para respondedoras a tratamiento con Ab N° 6 y no respondedoras a tratamiento con Ab N° 6.

Más específicamente, los valores de índice de reducción de crecimiento (IRC) determinados para las líneas celulares ADRr, ACHN, DU145 y MALME3 (descritos adicionalmente en el Ejemplo 1) se convirtieron en un resultado binario para entrenamiento de estratificación estableciendo “respondedora” como que tienen un nivel de pErbB3 que es mayor que el nivel de pErbB3 en células ADRr (es decir, un $pErbB3 > pErbB3(ADRr)$), donde “no respondedoras” se establecieron como que tienen un nivel de pErbB3 que es menor que el nivel de pErbB3 en células ADRr (es decir, un $pErbB3 < pErbB3(ADRr)$). Se ha de observar que esta no fue una predicción de modelo; en lugar de ello, esto fue parte del proceso de entrenamiento de estratificación.

Para las cuatro líneas celulares, los valores de IRC determinados experimentalmente se representaron frente a los valores de NAS calculados (pErbB3 normalizado integrado en el tiempo). Los valores de IRC, en el eje x, se dividieron en las respondedoras ($pErbB3 > pErbB3(ADRr)$) y no respondedoras ($pErbB3 < pErbB3(ADRr)$). Los datos de entrenamiento de NAS (obtenidos como se ha descrito en el Ejemplo 4) permitieron la división del eje y de Estados de Activación de Red en tres categorías: Respondedoras Simuladas (“R Sim”), No Respondedoras Simuladas (“NR Sim”) e Indeterminadas Simuladas (“I Sim”). Dos líneas de células de xenoinjerto se caracterizaron mediante valores de reducción de índice de crecimiento de más del 20% (DU145, ACHN) y de estas, la línea de células DU145 tenía el Estado de Activación de Red más bajo. En consecuencia, el umbral para clasificar una línea celular como una respondedora simulada se estableció en un Estado de Activación de Red mayor que o igual al nivel de ADRr. De forma similar, el xenoinjerto de línea de células MALME3 fue una no respondedora ($pErbB3 < pErbB3(ADRr)$) y, por lo tanto, los Estados de Activación de Red de las líneas celulares que son menores que el nivel de ADRr se clasificaron como No Respondedoras Simuladas. Los Estados de Activación de Red entre estos y los umbrales de ADRr y DU145 se clasifican como Indeterminadas Simuladas.

El Estado de Activación de Red, como se ha indicado mediante los niveles de pErbB3 calculados, se simuló para un panel de 15 líneas celulares para las cuales estaban disponibles las mediciones experimentales de HRG, BTC, ErbB1, ErbB2 y ErbB3. Los niveles de pErbB3 integrados calculados para las 15 células se representaron, junto con los niveles de las 4 líneas de células de entrenamiento, en el gráfico de barras mostrado en la Figura 8A, desde los niveles más altos hasta los más bajos de pErbB3. Los valores de NAS calculados para estas 15 líneas celulares posteriormente se clasificaron frente a los valores de NAS determinados previamente para las 4 líneas de células en entrenamiento ADRr, ACHN, DU145 y MALME3M. Los resultados de NAS para las 19 líneas celulares en total se clasifican como se muestra en el gráfico de la Figura 8B. Los valores de NAS iguales o por debajo de la línea de células MALME3M se establecieron como no respondedoras simuladas (“NR Sim”), los valores de NAS entre los de las líneas de células MALME3M y DU145 se establecieron como indeterminados simulados (“I Sim”) y los valores de NAS iguales a o superiores a los de la línea de células DU145 se establecieron como respondedoras simuladas (“R Sim”). Por tanto, como se ilustra en la Figura 8B, se predijo que las líneas de células IGROV1 (NCI-60, muestra cósmica ID N° 905968), MDA-MB-361 (ATCC N° HTB-27), SKMEL-5 (ATCC N° HTB-70), MDA-MB-231 (ATCC N° HTB-26) y T47D (ATCC N° HTB-133) eran no respondedoras simuladas, ya que sus valores de NAS calculados estaban por debajo de los de MALME3M. Además, las líneas de células ZR75-1 (ATCC N° CRL-1500), HOP92 (NCI-60, muestra cósmica ID N° 905973) y HOP62 (NCI-60, muestra cósmica ID N° 905972) se predijo que eran indeterminadas simuladas, ya que sus valores de NAS calculados estaban entre los de ADRr y DU145. Finalmente, las líneas de células SKBR3 (ATCC N° HTB-30), UACC62 (NCI-60, muestra cósmica ID N° 905976), EKVX (NCI-60, muestra cósmica ID N° 905970), BT474 (ATCC N° HTB-20), SKOV3 (ATCC N° HTB-77), OVCAR8 (obtenida en el Instituto Nacional del Cáncer, División de Tratamiento y Diagnóstico del Cáncer) y CAK11 (NCI-60, muestra cósmica ID N° 905963) se predijo que eran respondedoras simuladas, ya que sus valores de NAS calculados eran mayores que los de ADRr.

Para ensayar estas predicciones de modelo, se llevaron a cabo tres estudios de xenoinjerto *in vivo* adicionales. Se usaron las líneas de células IGROV1, OVCAR8 y SKOV3 en estudios de xenoinjerto conducidos como se ha descrito en el Ejemplo 1, donde ratones se trataron con 600 µg de Ab N° 6 cada 3 días o con PBS como un control. Las respuestas de xenoinjerto, determinadas por cambios en volumen de tumor (en mm³) a lo largo del tiempo, se resumen en los gráficos de las Figuras 9A-9C. Nuevamente, los valores de Reducción de Índice de Crecimiento (RIC) para cada línea celular se calcularon usando la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción de Índice de Crecimiento} = 1 - (\text{Índice de Crecimiento Ab N° 6})/(\text{Índice de Crecimiento PBS})$$

Los valores de RIC para las cuatro líneas celulares ensayadas se resumen en la Tabla 14 más adelante:

Tabla 14: Resumen de la reducción de índice de crecimiento tumoral para conjunto predicho de estudios de xenoinjerto

<u>Línea Celular</u>	<u>RIC [%]</u>
IGROV1	6,3
OVCAR8	91,4
SKOV3	19,6

- 5 Con respecto a la predicción de la sensibilidad a Ab N° 6 para cada línea celular, en base a los criterios de que una respondedora de xenoinjerto tiene que tener un nivel de pErbB3 simulado mayor que el pErbB3 simulado de ADRr, el xenoinjerto de IGROV1 se categorizó como no respondedora, mientras que los xenoinjertos de OVCAR8 y SKOV3 se categorizaron como respondedoras.
- 10 Estos datos demuestran que las predicciones hechas en base a los valores de NAS calculados corresponden precisamente a la sensibilidad observada experimentalmente de las tres líneas de células de ensayo frente a tratamiento con Ab N° 6 *in vivo* en los estudios de xenoinjerto. Más específicamente, la línea de células IGROV1 se predijo que era una no respondedora simulada en base a su valor de NAS calculado y se observó experimentalmente que era no respondedora en base a su valor de RIC. De forma similar, las líneas de células
- 15 OVCAR8 y SKOV3 se predijo que eran respondedoras simuladas en base a sus valores de NAS calculados y se observó experimentalmente que eran respondedoras en base a sus valores de RIC.

Por consiguiente, estos experimentos confirmaron la eficacia del modelo computacional y el valor de NAS calculado de niveles de pErbB3 normalizados integrados en el tiempo, como predictivos de sensibilidad frente a tratamiento con Ab N° 6 *in vivo*.

Ejemplo 8: Identificación de biomarcadores directos para sensibilidad a Ab N° 6

En este ejemplo, los datos obtenidos a partir de las cuatro líneas celulares examinadas en los estudios de xenoinjerto descritos en el Ejemplo 1 (ADRR, ACHN, DU154 y MALME3M) y las tres líneas celulares examinadas en los estudios de xenoinjerto descritos en el Ejemplo 7 (IGROV1, OVCAR8 y SKOV3) se examinaron adicionalmente para determinar si se podían identificar biomarcadores directos de sensibilidad a Ab N° 6.

En primer lugar, se examinó si las concentraciones de receptor para ErbB1, ErbB2 y ErbB3 clasificaban de forma eficaz los datos de xenoinjerto en respondedores y no respondedores. Como se ilustra en los gráficos de las Figuras 10A-10D (en los cuales se representa el logaritmo de la concentración de un receptor frente al logaritmo de la concentración de uno o más de los otros receptores), únicamente las mediciones de receptor ErbB1 parecían clasificar los datos de xenoinjerto en respondedores y no respondedores, mientras que ninguno de los otros receptores lo hacía.

A continuación, se examinó si la concentración de HRG en combinación con una concentración de receptor (por ejemplo, ErbB1, ErbB3) clasificaba de forma eficaz los datos de xenoinjerto en respondedores y no respondedores. Como se ilustra en el gráfico de la Figura 11 (en el cual se representa el logaritmo de la concentración de HRG frente al logaritmo de la concentración de ErbB1), estas dos mediciones de concentración, HRG y uno de los receptores ErbB, fueron capaces de clasificar con precisión los datos de xenoinjerto en respondedores y no respondedores. Más específicamente, los datos de las tres no respondedoras MALME3, ADRr e IGROV1, eran separables de los datos de las seis respondedoras, permitiendo de ese modo la clasificación de no respondedoras frente a respondedoras.

Por consiguiente, los biomarcadores directos de sensibilidad de Ab N° 6 se identificaron como HRG en combinación con uno de los receptores de la ruta de ErbB (por ejemplo, ErbB1, ErbB3).

La Tabla 15 más adelante resume las respondedoras y no respondedoras predichas para las líneas celulares estudiadas en el Ejemplo 7 usando los biomarcadores directos de Ab N° 6 para realizar las predicciones. La predicción determinada usando los biomarcadores directos se correspondía bien con las predicciones determinadas usando los valores de NAS (como se ha descrito en el Ejemplo 7). Por ejemplo, las líneas de células ACHN, DU145, OVCAR8 y SKOV3 se habían identificado previamente como respondedoras usando los valores de NAS y también se predijo que eran respondedoras usando los biomarcadores directos. De forma similar, las líneas de células ADRr, MALME3M e IGROV1 se habían identificado previamente como no respondedoras usando los valores de NAS y también se predijo que eran no respondedoras usando los biomarcadores directos.

Tabla 15: Respondedoras y no respondedoras predichas usando los biomarcadores directos de Ab N° 6

Respondedoras	Intermedias	No Respondedoras
ACHN	SKBR3	ADDr
CAKI1		BT474
DU145		HOP92
EKVX		IGROV1
HOP62		MALME3M
MDA-MB-231		MDA-MB-361
OVCAR8		SKMEL5
SKOV3		T47D
		UACC62
		ZR75-1

Al comparar los resultados del Ejemplo 7 usando el NAS para separar respondedoras de no respondedoras con los resultados del Ejemplo 8 usando los biomarcadores directos para la separación, las únicas diferencias fueron para las líneas de células BT474, MDA-MB-231 y UACC62. No es sorprendente que existen algunas diferencias entre estos métodos de clasificación distintos. En esta situación, las líneas celulares en disputa se consideran respondedoras ya que, en el contexto de estratificación de pacientes, los falsos positivos son preferibles a los falsos negativos.

Ejemplo 9: Comparación de los niveles de expresión de proteína entre xenoinjertos y tumores humanos mediante ELISA y qIHC

En este ejemplo, se evaluaron las similitudes o diferencias en los perfiles de expresión de proteína observados en xenoinjertos en comparación con los perfiles de expresión de proteína observados en tumores humanos. Esto se realizó para determinar si los niveles de proteína observados en los xenoinjertos eran comparables con los niveles de proteína observados en tumores humanos.

En un primer conjunto de experimentos, los niveles de expresión de proteína se miden mediante ELISA. Se preparan lisados a partir de tumores congelados de forma inmediata de muestras de tumor humano o de xenoinjertos, como se ha descrito sustancialmente con detalle en el Ejemplo 2 y se analizan mediante ELISA para determinar niveles de proteína de ErbB1-4, HRG-β1 y BTC, también como se ha descrito sustancialmente en el Ejemplo 2. Los resultados (obtenidos usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos) se representan en los gráficos de de las Figuras 12A-12C. Los resultados demuestran que los valores obtenidos para los niveles de proteína en las muestras de xenoinjerto están intercalados en gran medida con los valores obtenidos para los niveles de proteína en las muestras de tumor humano de origen de tejido diferente, indicando que los niveles de proteína observados en los xenoinjertos son comparables con los niveles de proteína observados en tumores humanos. En base a estos datos, se afirma que los umbrales de NAS determinados para la predicción de sensibilidad en xenoinjertos se pueden aplicar para predecir respondedoras usando muestras de tejido de tumor humano.

Ya que las muestras de tejido congelado pueden ser difíciles de obtener en un entorno clínico, se llevó a cabo un segundo conjunto de experimentos usando técnicas de medición que permitían la cuantificación de proteína en muestras Incrustadas en Parafina y Fijadas en Formalina (FFPE). Más específicamente, se realizó inmunohistoquímica cuantitativa (qIHC) usando el sistema QUA® (HistoRx, Inc., New Haven, CT). Usando inmunofluorescencia y un panel de línea celular con niveles de expresión de proteína representativos, se preparó una curva normal de línea celular. La curva normal de línea celular después permitió el retrocálculo del nivel de expresión de proteína en muestras de tumor y xenoinjertos. Los resultados se muestran en las Figuras 13A-13D. La Figura 13A muestra una curva normal de línea celular para ErbB1. Las Figuras 13B, 13C y 13D muestran gráficos de barra que representan los valores de qIHC de ErbB1, ErbB2 y ErbB3, respectivamente, en las líneas de células de xenoinjerto (barras rojas) y en las muestras de tumor humano (barras azules). Los resultados de qIHC demostraron la similitud en los niveles de expresión de proteína entre las muestras de tumor humano y las muestras de xenoinjerto, que abarcan una amplia gama de niveles de expresión de proteína. Estos resultados apoyan nuevamente la afirmación de que los umbrales de NAS determinados para la predicción de sensibilidad en xenoinjertos se pueden aplicar para predecir respondedoras usando muestras de tejido de tumor humano.

Ejemplo 10: Correlación de sensibilidad con heterodímeros fosforilados

En este ejemplo, niveles integrados de homo y heterodímeros de ErbB fosforilados se calcularon como valores de NAS para determinar si los mismos se correlacionaban con sensibilidad a tratamiento con Ab N° 6.

Se usó el mismo modelo computacional preparado como se ha descrito en el Ejemplo 4. Este modelo se generó en base a mediciones determinadas experimentalmente para los niveles de ErbB1, ErbB2, ErbB3, HRG- β 1 y BTC. Como se ha descrito en el Ejemplo 4, se implementaron siete hetero y homodímeros de ErbB que se habían descrito en la bibliografía en el modelo: ErbB1/1, ErbB1/2, ErbB1/3, ErbB1/4, ErbB2/2, ErbB2/3 y ErbB2/4. La mayoría de estos dímeros se activan por unión a ligando pero varios surgen a través de un proceso de "señalización lateral" (o dimerización secundaria) en el cual los dímeros fosforilados en una manera dependiente de ligando se disocian en monómeros que después se homo o heterooligomerizan con monómeros activados o inactivados para crear dímeros activos. El modelo computacional se entrenó con un conjunto de datos experimentales que permitió la identificación de los dímeros que se forman en presencia de HRG o BTC usando la línea de células ADRr.

Por tanto, los niveles integrados de homo y heterodímeros fosforilados se calcularon como una medida del Estado de Activación de Red (NAS) para las siguientes líneas celulares: MALME3M, BT474, IGROV1, ADRr, OVCAR8, SKOV3, DU145 y ACHN. Como se muestra en el gráfico de la Figura 14, los niveles calculados de heterodímeros ErbB1/3 fosforilados (pErbB1: 3) separaron las ocho líneas celulares en no respondedoras (MALME3M, BT474, IGROV1, ADRr) y respondedoras (OVCAR8, SKOV3, DU145 y ACHN) frente a Ab N° 6. Esta separación en base a los niveles de pErbB1: 3 calculados se correlacionaba de forma idéntica con las no respondedoras y las respondedoras predichas determinadas usando los biomarcadores directos como se describen en el Ejemplo 8. Esta separación en base a los niveles de pErbB1: 3 calculados también se correlacionaba casi de forma idéntica con las no respondedoras y respondedoras predichas determinadas usando el nivel de pErbB3 calculado para el valor de NAS como se describe en el Ejemplo 7, con la única diferencia de que la línea de células BT474, que se había identificado como una no respondedora usando tanto los biomarcadores directos como los niveles de pErbB1: 3 calculados, pero que se había identificado como una respondedora usando los niveles de pErbB3 calculados.

Los niveles de dímeros ErbB1/1, ErbB1/2, ErbB1/3, ErbB1/4, ErbB2/2, ErbB2/3 y ErbB2/4 también se calcularon usando el modelo computacional, pero ninguno de los niveles de ninguno de estos homo o heterodímeros separaron las líneas celulares en respondedoras y no respondedoras para tratamiento con Ab N° 6. Por tanto, los resultados observados con los heterodímeros ErbB1/3 eran únicos entre los dímeros examinados.

Estos resultados demuestran que los niveles integrados de homo o heterodímero de ErbB fosforilado se pueden usar como el valor de NAS en los métodos predictivos de la invención y, más específicamente, que el nivel calculado de pErbB1: 3 es un valor de NAS preferido para predecir sensibilidad a tratamiento con Ab N° 6. Estos resultados se interpretan como que significan que Ab N° 6 es particularmente eficaz en cánceres con altos niveles de heterodímeros ErbB1:3 y, por lo tanto, que la medición directa de los niveles de heterodímeros ErbB1:3 totales o heterodímero pErbB1:3 también se puede usar como biomarcador directo para predecir la eficacia del tratamiento con Ab N° 6.

Ejemplo 11: Construcción y entrenamiento de un modelo computacional de los efectos de un agente terapéutico sobre la ruta de señalización de ErbB

En este ejemplo se usó el enfoque descrito en el Ejemplo 4 para construir un modelo computacional mecanicista para construir y entrenar un modelo de la ruta de señalización de ErbB y, además, para desarrollar una representación computacional del mecanismo mediante el cual un agente terapéutico particular inhibe la ruta de señalización.

El agente terapéutico usado en este ejemplo es el anticuerpo biespecífico H3 x B1D2 (cuya secuencia de aminoácidos se muestra en SEC ID N°: 41 y que se describe adicionalmente en la Patente de Estados Unidos N° 7.332.585, Patente de Estados Unidos N° 7.332.580 y Solicitud PCT PCT/US2006/023479, publicada como documento WO 2007/084187 y Solicitud PCT PCT/US2007/024287, publicada como documento WO 2008/140493). Este anticuerpo biespecífico está compuesto de un anticuerpo de cadena única anti-ErbB3 enlazado a un anticuerpo de cadena única anti-ErbB2.

Se predijo que el agente H3 x B1D2 se dirigía preferentemente a tumores que sobreexpresan ErbB2. Por tanto, se construyó un modelo computacional de la ruta de señalización de ErbB en presencia de ErbB2 sobreexpresado usando los métodos y modelos descritos en el Ejemplo 4. El modelo incorporaba interacciones entre HRG y receptores ErbB1, ErbB2 y ErbB3, conduciendo a tráfico de receptor y señalización intracelular cadena debajo de AKT, produciendo AKT fosforilado (pAKT). Las interacciones incluidas eran sustancialmente idénticas a aquellas encontradas en el modelo del Ejemplo 4. Por el contrario al modelo del Ejemplo 4, las reacciones relacionadas con el ligando BTC no se incluyeron en este modelo.

Este modelo se calibró para coincidir con los datos experimentales para la línea de células mamarias que sobreexpresan ErbB2 BT474-M3 (la línea celular se describe en, por ejemplo, Drummond *et al.* (2005) Clin. Cancer Res. 11: 3392; Park *et al.* (2002) Clin. Cancer Res. 8: 1172; Kirpotin *et al.* (2006) Cancer Res. 66: 6732). La calibración del modelo dio como resultado únicamente diferencias menores en valores de parámetros en comparación con el modelo del Ejemplo 4. La diferencia más significativa fue una reducción en las velocidades de internalización y degradación de receptor ErbB. Este cambio es consistente con los datos conocidos que sugieren que la sobreexpresión de ErbB2 reduce las velocidades de internalización/tráfico de otros receptores ErbB, tales

como ErbB1 (véase, por ejemplo, Hendriks *et al.* (2003) J. Biol. Chem. 278: 23343-23351; Wang *et al.* (1999) Mol. Biol. Cell 10: 1621-1636; Haslekas *et al.* (2005) Mol. Biol. Cell 16: 5832-5842).

Para entrenar el modelo, se usó un conjunto de datos que comprendían matrices de dosis-tiempo en las cuales se medía la fosforilación de ErbB1, ErbB2, ErbB3 y AKT en múltiples puntos de tiempo y a seis concentraciones diferentes de estimulación con HRG en células BT474-M3 mediante ELISA.

Para estimulación de las células, las células se siembran en pocillos duplicados con 1000 μ l de medio completo a 150.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de 12 pocillos (para ELISA de 96 medios pocillos) o en placas duplicadas de 100 μ l de medio completo a 20.000 células por pocillo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (para ELISA de 384 pocillos). Estas células se incuban durante una noche en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, el 95% de aire y 37 grados Celsius. Las células después se cambian a suero sin medio: medio RPMI-1640 (Gibco) complementado con L-glutamina 2 mM (Gibco) y unidades/ml de Pen-Strep (Gibco). Las células en inanición se incuban en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%, el 95% de aire y 37 grados Celsius durante 20-24 horas antes de la estimulación. Para estudios de matriz de dosis-tiempo, las dosis se estimulan con ligando (HRG) a 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. A continuación de la estimulación con seis concentraciones diferentes de HRG (0,098 nM-100 nM) para cada curso de tiempo, las células se colocan en hielo, se lavan con PBS frío, después se lisan en 100 μ l para placas de 12 pocillos y 45 μ l para placas de 96 pocillos en Tampón de Extracción de Proteína de Mamífero M-PER (Thermo Scientific, N° de Catálogo 78501) complementado con cóctel inhibidor de proteasa (Sigma-Aldrich, P2714), ortovanadato de sodio 1 mM (Sigma- Aldrich, S6508), pirofosfato de sodio 5 mM (Sigma-Aldrich, 221368), oxofenilarsina 50 μ M (EMD Biosciences, 521000) y bpV (phen) 10 μ M (EMD Biosciences, 203695).

Los niveles de fosforilación de proteína en las células estimuladas se miden mediante ELISA. ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se miden usando los kits de R&D Systems Duoset IC (ErbB1 DYC1095- E, ErbB2 DYC1768- E, ErbB3 DYC1769- E). Los anticuerpos de captura frente a ErbB1 (R&D Systems, 841402), ErbB2 (R&D Systems, 841425), ErbB3 (R&D Systems, 841428) y AKT (Upstate, 05- 591MG) se incuban en placas de 96 medios pocillos (Greiner, N° de Catálogo 82050- 046) o placas de 384 pocillos (Nunc N° de Cat 40518) que son placas de unión elevada de poliestireno de fondo plano negras durante una noche a temperatura ambiente. Las placas de ELISA se bloquean con albúmina sérica bovina al 2% (BSA) y solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante una hora y después se incuban con lisados diluidos en BSA al 2%, Tween-20 al 0,1% y PBS durante dos horas a temperatura ambiente. Entre cada incubación, las placas se lavan tres veces con Tween-20 al 0,05% en PBS. Los ELISA para medir fosfo-ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se incuban con anticuerpo de Detección Anti-Fosfotirosina-HRP (R&D Systems, 841403) durante dos horas. Los ELISA para medir fosfo AKT se incuban con anticuerpo monoclonal anti-fosfo AKT de ratón específico de serina 473 primario (Cell Signaling Technologies, N° de Catálogo 5102) durante 2 horas, después se incuban con Estreptavidina-HRP (R&D Systems, N° de Catálogo DY998) durante 20 minutos. Todos los ELISA se visualizan con Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Pierce, N° de Catálogo 37069) y la señal de luminiscencia se mide usando un luminómetro.

Como se muestra en la Figura 21, el modelo coincidió con los datos de señalización de pErbB3 inducida por HRG en la línea de células que sobreexpresa ErbB2 BT474-M3 a todas las dosis de HRG examinadas experimentalmente. Adicionalmente, el modelo coincidió con los datos de señalización de pAKT inducida por HRG en células BT474-M3 a dosis de HRG de aproximadamente 5 nM e inferiores.

A continuación, se desarrolló una representación computacional del mecanismo mediante el cual H3 x B1D2 inhibe la señalización dependiente de HRG de la ruta de ErbB. La representación computacional del inhibidor se construyó usando ecuaciones de reacción de acción de masas que describen la unión del inhibidor a ErbB2 y ErbB3 e inhibición posterior de señalización inducida por HRG. Los parámetros para los acontecimientos de unión se obtuvieron mediante una combinación de medición directa (usando técnicas ampliamente conocidas en la técnica) y entrenamiento computacional del modelo para igualar los datos para la inhibición de pErbB3 inducida por HRG en células mediante H3 x B1D2. En particular, el índice de asociación y el índice de disociación para la unión del brazo de cadena única H3 del anticuerpo biespecífico a ErbB3 y el índice de asociación y disociación para la unión del brazo de cadena único B1D2 del anticuerpo biespecífico a ErbB2 se determinaron experimentalmente mediante tecnología BIAcore y KinExA convencional. Las reacciones y parámetros del modelo computacional de H3 x B 1 D2 aparecen en las Tablas 16a y 16b.

Tabla 16A

Número de reacción	Reacción	Parámetro directo	Parámetro inverso
Implementación de H3 x B1D2			
H3xB1D2_v1	$E2 + (H3 \times B1D2) \leftrightarrow E2:(H3 \times B1D2)$	h3xb1d2_kf1	h3xb1d2_kr1
H3xB1D2_v2	$(H3 \times B1D2) + E3 \leftrightarrow (H3 \times B1D2):E3$	h3xb1d2_kf2	h3xb1d2_kr2

Número de reacción	Reacción	Parámetro directo	Parámetro inverso
Implementación de H3 x B1D2			
H3xB1D2_v3	$E2 + (H3 \times B1D2):E3 \leftrightarrow E2:(H3 \times B1D2) E3$	h3xb1d2_kf3	h3xb1d2_kr1
H3xB1D2_v4	$E2:(H3xB1D2) + E3 \leftrightarrow E2:(H3xB1D2) E3$	h3xb1d2_kf4	h3xb1d2_kr2
H3xB1D2_v5	$E2:(H3 \times B1D2) + E2:(H3 \times B1D2) \rightarrow E2:E2$	h3xb1d2_kf5	
H3xB1D2_v6	$E2:(H3xB1D2)+E2 \rightarrow E2:E2$	h3xb1d2_kf5	
H3xB1D2_v7	$E2:(H3 \times B1D2) + E2 p \rightarrow E2:E2_p$	h3xb1d2_kf5	
H3xB1D2_v8	$E2:(H3xB1D2) + E1 \rightarrow E1:E2$	h3xb1d2_kf6	
H3xB1D2_v9	$E2:(H3xB1D2)+ E3 \rightarrow E2:E3$	h3xb1d2_kf6	
H3xB1D2_v10	$E2 + (H3xB1D2):E3 \rightarrow E2:E3$	h3xb1d2_kf6	
H3xB1D2_v11	$E2:(H3 \times B1D2) + E3:HRG \rightarrow E2:E3:HRG$	h3xb1d2_kf7	
H3xB1D2_v12	$E2:(H3 \times B1D2) + E3:HRG_p \leftrightarrow E2:E3: HRG_p$	h3xb1d2_kf7	
H3xB1D2_v13	$E1 +(H3xB1D2):E3 \rightarrow E1:E3$	h3xb1d2_kf8	
**En este esquema de reacción, la cantidad de (H3 x B1D2) libre se mantiene constante.			

Tabla 16B

Nombre	Valor	Unidades
Parámetros de H3 x B1D2		
h3xb1d2_kf1	3,13E+04	(mol/l)-1 s-1
h3xb1d2_kr1	1,50E-04	s-1
h3xb1d2_kf2	3,50E+05	(mol/l)-1 s-1
h3xb1d2_kr2	2,20E-02	s-1
h3xb1d2_kf3	1,08E-06	(moléculas/célula)-1s-1
h3xb1d2_kf4	1,20E-05	(moléculas/célula)-1s-1
h3xb1d2_kf5	1,67E-08	(moléculas/célula)-1s-1
h3xb1d2_kf6	5,00E-08	(moléculas/célula)-1 s-1
h3xb1d2_kf7	5,00E-07	(moléculas/célula)-1s-1
h3xb1d2_kf8	5,00E-08	(moléculas/célula)-1s-1

- 5 El modelo de señalización de ErbB se combinó con el modelo de inhibidor y se usó para predecir los datos experimentales para la inhibición de señalización de pErbB3 y pAKT mediante H3 x B1D2. Los datos experimentales se generaron usando la misma metodología descrita anteriormente, con la excepción de que se añadieron concentraciones de H3 x B1D2 que variaban de 15 pM a 1 μ M durante el ayuno de suero. Adicionalmente, los datos de inhibición se generaron usando un punto de tiempo de lisis de diez minutos después de estimulación con HRG 5 nM. El modelo recapituló de forma satisfactoria resultados experimentales que muestran que la CI_{50} de inhibición para H3 x B1D2 no cambió mucho en diferentes líneas celulares, pero el porcentaje de inhibición sí cambió enormemente. Una causa principal del cambio del porcentaje de inhibición fue el nivel de expresión de ErbB2. Esto se demostró en experimentos donde ErbB2 se transfeció en la línea de células OVCAR8 para crear una línea de células que sobreexpresa ErbB2 (denominada OVCAR8-HER2). Las curvas de inhibición de pErbB3 y pAKT para células OVCAR8 tratadas con H3 x B1D2 se compararon con las mismas curvas de inhibición para células OVCAR8-HER2 tratadas con H3 x B1D2. Los resultados se muestran en las Figuras 17A-D, donde las Figuras 17A y 17B muestran las curvas de inhibición para pErbB3 y pAKT, respectivamente, en células OVCAR8 tratadas con H3 x B1D2 (experimentalmente o simuladas en el modelo) y las Figuras 17C y 17D muestran las curvas de inhibición para pErbB3 y pAKT, respectivamente, en células OVCAR8-HER2 tratadas con H3 x B1D2 (experimentalmente o simuladas en el modelo). Las CI_{50} para las células tratadas experimentalmente ("DR50datos") y las células tratadas simuladas ("DR50sim") también se muestran. Los datos muestran que niveles más elevados de expresión de ErbB2 dan como resultado un porcentaje de inhibición mayor mediante tratamiento con H3 x B1D2.

Además del papel principal de ErbB2 en la modulación del porcentaje de inhibición, se desveló un papel inesperado para ErbB1 mediante el modelo computacional. Este papel de ErbB1 se ilustró mediante una simulación que mostraba el efecto de añadir ARNi de ErbB1 a células ADRr, para simular la regulación negativa de ErbB1. Las células ADRr expresan únicamente niveles bajos de ErbB2 y mostraban un porcentaje pobre de inhibición mediante H3 x B1D2 tanto en el modelo computacional como en los datos determinados experimentalmente. Estos datos se muestran en las Figuras 18A y 18B, que muestran las curvas de inhibición para pErbB3 y pAKT, respectivamente, en células ADRr tratadas con H3 x B1D2, experimentalmente o simuladas en el modelo. Las CI_{50} para las células tratadas experimentalmente ("DR50datos") y las células tratadas simuladas ("DR50sim") también se muestran. Sin embargo, la regulación negativa de la expresión de ErbB1 (mediante simulación de adición de ARNi) dio como resultado un porcentaje de inhibición mayor en la simulación, como se muestra en las Figuras 18C y 18D, que muestran las curvas de inhibición para pErbB3 y pAKT, respectivamente, en células ADRr simuladas para tratamiento con ARNi de ErbB1 y H3 x B1D2. La implicación de los resultados a partir de la simulación de ARNi de ErbB1 es que la expresión de ErbB1 es un biomarcador de respuesta negativa para H3 x B1D2.

En resumen, el modelo computacional y los datos experimentales indicaron que existen dos mecanismos para modular de forma negativa la sensibilidad a H3 x B1D2 *in vitro*: (i) un nivel de ErbB2 insuficientemente elevado; y (ii) niveles de ErbB 1 elevados. Por el contrario, niveles elevados de expresión de ErbB2 y niveles bajos de expresión de ErbB1 se correlacionaban con sensibilidad aumentada a H3 x B1D2.

Ejemplo 12: Sensibilidad *in vivo* a tratamiento con H3 x B1D2 se correlaciona con sensibilidad predicha a partir de un modelo computacional

En este ejemplo, la sensibilidad *in vivo* de tumores frente a tratamiento con H3 x B1D2 se correlacionó con los niveles calculados de diversos componentes en la ruta de ErbB para identificar biomarcadores directos e indirectos de sensibilidad a tratamiento con H3 x B1D2.

Para caracterizar la respuesta *in vivo* de tumores frente a tratamiento con H3 x B1D2, se ensayó un panel de líneas de células tumorales en un modelo de tumor de xenoinjerto tal como se ha descrito en el Ejemplo 1. En los modelos de tumor de xenoinjerto, ratones (ratones nu/nu: ratones hembra de 4-5 semanas de edad, atímicos, desnudos, antecedentes exogámicos; Albino; adquiridos en Charles River Labs, Wilmington, MA) se implantan en el flanco con $5 \times 10^6 - 2 \times 10^7$ células/ratón (dependiendo de la línea celular) en 200 μ l a través de inyección subcutánea. Los ratones se supervisan para crecimiento de tumor inicial. Se permite que los tumores crezcan durante varios días hasta que el volumen de tumor medio es aproximadamente 150-200 mm³. El volumen de tumor se calcula como $V = (\pi/6) (L \times W^2)$. Los ratones se tratan con el anticuerpo H3 x B1D2 a una dosis de 600 μ g/inyección cada 3 días (q3d). Los ratones de control se tratan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o con HSA de tipo silvestre (albúmina sérica humana). El volumen de tumor se mide durante 40-80 días.

Se examinaron las siguientes doce líneas de células tumorales: ACHN, ADRr, IGROV1, LS180, MIA PaCa2, ZR75-1, MDA- MB- 361, ADRr- HER2 (células ADRr transfectadas para sobreexpresar HER2), NCI- N87, CALU- 3, SKOV- 3 y BT474-M3. Para el uso de estas líneas celulares en el modelo computacional, se determinaron experimentalmente los niveles de expresión de ErbB1, ErbB2 y ErbB3 en cada línea celular usando los métodos descritos anteriormente o variaciones menores de los mismos, cuyos resultados se muestran más adelante en la Tabla 17:

Tabla 17: Niveles de receptor ErbB

Línea celular	ErbB1	ErbB2	ErbB3
ACHN	448284	45456	15200
ADrR	177818	40792	33205
BT474-M3	129436	1706601	49238
SKOV3	264132	1377661	13694
ZR75-1	37409	199132	39492
IGROV1	149031	158418	5355
OVCAR8	236157	53272	31813
MDA-MB-361	65855	371731	32981
NCI-N87	417753	1233479	34678
Calu-3	161357	1196976	30031
LS180	122520	143339	28841
MIAPaCa-2	138563	84865	5735
ADrR-HER2	271000	722000	34400

Los datos de control y tratamiento para los experimentos de xenoinjerto *in vivo* se ajustaron a curvas de crecimiento exponencial, usando la siguiente fórmula: $V = V_0 \cdot \exp(k \cdot t)$

donde V es el volumen del tumor, V_0 es el volumen del tumor en tiempo cero, k es el índice de crecimiento exponencial y t es el tiempo. La potencia de H3 x B1D2 para inhibir el crecimiento tumoral se representó como la proporción de índices de crecimiento exponencial de tratamiento y de control para cada línea celular ensayada. Esta proporción se denominó "índice de crecimiento relativo" (ICR) y se representa como:

$$ICR = k_{H3 \times B1D2} / k_{control}$$

Un índice de crecimiento relativo (ICR) de 1 significaba que el agente no tenía efecto. Un ICR de 0 significaba que el agente detenía el crecimiento del tumor por completo. Un ICR negativo significaba que el agente provocaba regresión tumoral.

De las doce líneas celulares examinadas, únicamente BT474-M3 tenía un ICR negativo (es decir, H3 x B1D2 provocaba regresión tumoral únicamente en esta línea celular). Dos líneas celulares, IGROV1 y LS180, tenían valores de ICR mayores de 1, indicando que H3 x B1D2 no tenía ningún efecto sobre el crecimiento tumoral de estas líneas celulares. Las nueve líneas celulares restantes tenían valores de ICR entre 0 y 1, indicando que H3 x B1D2 inhibía parcialmente el crecimiento tumoral de estas líneas celulares.

Los valores de ICR para las doce líneas celulares se representaron frente a niveles calculados por modelo de monómero ErbB2, homodímero ErbB2:ErbB2 y heterodímero ErbB2:ErbB3 en las líneas celulares en ausencia del inhibidor H3 x B1D2, en base a los niveles medidos de ErbB1, ErbB2 y ErbB3 en cada una de las líneas celulares. Los resultados se ilustran en las Figuras 19A-C, que muestran gráficos de los índices de crecimiento relativos (ICR) determinados *in vivo* para el panel de células tumorales en el modelo de xenoinjerto tratadas con H3 x B1D2 representados frente a los niveles calculados de monómeros ErbB2 (Figura 19A), homodímeros ErbB2:ErbB2 (Figura 19B) y heterodímeros ErbB2:ErbB3 (Figura 19C) en el panel de células tumorales en ausencia de H3 X B1D2.

Los resultados en la Figura 19 muestran que existe una relación lineal entre ICR y los niveles calculados de monómeros ErbB2, homodímeros ErbB2:ErbB2 y heterodímeros ErbB2:ErbB3. En vista de esta observación, la medición directa de monómeros ErbB2, homodímeros ErbB2:ErbB2 y/o heterodímeros ErbB2:ErbB3 se puede usar como biomarcador directo de sensibilidad a H3 x B1D2. Además, la medición de ErbB1, ErbB2 y ErbB3 en una muestra de tumor se puede usar para calcular los niveles de homodímeros ErbB2:ErbB2 y/o heterodímeros ErbB2:ErbB3 para estratificar la sensibilidad de tumor frente a tratamiento con H3 x B1D2 (es decir, los niveles medidos de ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se pueden usar como biomarcadores indirectos de sensibilidad a H3 x B1D2, que se usa para calcular los niveles de homodímeros ErbB2:ErbB2 y/o heterodímeros ErbB2:ErbB3). Por tanto, los niveles calculados de, por ejemplo, homodímeros ErbB2:ErbB2 y/o heterodímeros ErbB2:ErbB3 se pueden usar como un valor de Estado de Activación de Red (NAS) tras lo cual se puede predecir la sensibilidad al tratamiento con H3 x B1D2.

Los valores de ICR para las doce líneas celulares también se representaron frente a los niveles relativos calculados (por ejemplo, proporción) de homodímero ErbB2:ErbB2 y heterodímero ErbB1:ErbB3 en las líneas celulares en ausencia y presencia simulada del inhibidor H3 x B1D2. Un nivel relativo más bajo indica que H3 x B1D2 puede inhibir de forma más potente la formación de esa especie de heterodímero. Los resultados se ilustran en las Figuras 20A-B, que muestran gráficos de los índices de crecimiento relativo (ICR) determinados *in vivo* para un panel de células tumorales en un modelo de xenoinjerto tratadas con H3 x B1D2 representados frente a los niveles relativos calculados de heterodímeros ErbB2:ErbB3 (Figura 20A) y heterodímeros ErbB1:ErbB3 (Figura 20B) en el panel de células tumorales en presencia simulada de H3 x B1D2, en comparación con los niveles simulados de los heterodímeros en la ausencia simulada de H3 x B1D2.

Los resultados en la Figura 20 demuestran una correlación entre la capacidad del inhibidor de alterar los heterodímeros ErbB2:ErbB3 y ErbB1:ErbB3 y el índice de crecimiento relativo de los tumores. Es decir, las células tumorales (por ejemplo, células BT474-M3) en las cuales los niveles relativos calculados de heterodímero ErbB2:ErbB3 y ErbB1:ErbB3 son bajos en presencia simulada del inhibidor H3 x B1D2 (es decir, la alteración del heterodímero es elevada por el inhibidor) muestran valores de ICR bajos (indicando un efecto mayor del inhibidor sobre el crecimiento tumoral). Por el contrario, las células tumorales (por ejemplo, células ACHN) en las cuales los niveles relativos calculados de heterodímero ErbB2:ErbB3 y ErbB1:ErbB3 son elevados en presencia simulada del inhibidor H3 x B1D2 (es decir, alteración de heterodímero es baja por el inhibidor) muestran valores de ICR más elevados (indicando un efecto menor del inhibidor sobre el crecimiento tumoral). Estos resultados demuestran que la simulación de la presencia del agente terapéutico en el modelo computacional de la ruta de señalización, en comparación con la ausencia simulada del agente terapéutico, permite la generación de un Estado de Inhibición de Red (NIS), en base a los niveles relativos de heterodímero ErbB2:ErbB3 o ErbB1:ErbB3 y este NIS se puede usar como un predictor de la sensibilidad de células tumorales frente al agente terapéutico *in vivo*.

Ejemplo 13: Medición de afinidad de unión (K_D)

Las constantes de disociación de anticuerpos anti-ErbB se pueden medir usando cualquiera o ambas de dos técnicas independientes, un Ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial y un ensayo de unión celular.

Ensayo de resonancia de plasmón superficial

- 5 El Ensayo de Resonancia de Plasmón Superficial se realiza como se ha descrito en Wassaf *et al.* (2006) Analytical Biochem., 351: 241-253. Una implementación preferida usa un instrumento BIACORE 3000 (GE Healthcare) que usa una proteína ErbB recombinante como el analito y el anticuerpo anti-ErbB como el ligando. El valor de K_D se calcula en base a la fórmula $K_D = K_d/K_a$.

Ensayo de unión celular

- 10 Un ensayo de unión celular se lleva a cabo usando células A-431 para unión de ErbB 1, células ZR-75-1 para unión de ErbB2 o células MALME-3M para unión de ErbB3 (todas de la ATCC). El ensayo se realiza sustancialmente de la forma siguiente.

- 15 Las células se desprenden con 2 ml de tripsina-EDTA + 2 ml de RMPI + EDTA 5 mM a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se añade inmediatamente RPMI completo (10 ml) a las células tratadas con tripsina, se resuspenden suavemente y se centrifugan en una centrífuga de mesa Beckman a 1100 rpm durante 5 minutos. Las células se resuspenden en tampón de tinción BD (PBS + FBS al 2% + azida sódica al 0,1%, Becton Dickinson) a una concentración de 2×10^6 células por ml y alícuotas de 50 μ l (1×10^5 células) se siembran en placas en una placa de titulación de 96 pocillos.

- 25 Se preparan 150 μ l de solución de anticuerpo anti-ErbB 200 nM en tampón de tinción BD y se diluye en serie 2 veces en 75 μ l de tampón de tinción BD. Las concentraciones del anticuerpo diluido variaban desde 200 nM hasta 0,4 nM. Alícuotas de 50 μ l de las diferentes diluciones de proteína se añaden posteriormente directamente a los 50 μ l de suspensión celular proporcionando las concentraciones finales del anticuerpo de 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12 nM, 6 nM, 3 nM, 1,5 nM, 0,8 nM, 0,4 nM y 0,2 nM.

- 30 Las células divididas en alícuotas en la placa de 96 pocillos se incuban con las diluciones de proteína durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador de plataforma y se lavan 3 veces con 300 μ l del tampón de tinción BD. Posteriormente las células se incuban con 100 μ l de anticuerpo secundario (por ejemplo, una dilución 1:750 de anti-IgG humana de cabra marcado con Alexa647 en tampón de tinción BD) durante 45 minutos en un agitador de plataforma en la habitación fría. Finalmente, las células se lavan dos veces, se sedimentan y se resuspenden en 250 μ l de tampón de tinción BD + 0,5 μ g/ml de yoduro de propidio. El análisis de 10.000 células se lleva a cabo en un citómetro de flujo FACSCALIBUR usando el canal FL4. Los valores de MFI y las concentraciones correspondientes del anticuerpo anti-ErbB se representan en el eje y, y eje x, respectivamente. La K_D de la molécula se determina usando software GraphPad PRISM usando el modelo de unión de un sitio para una curva de regresión no lineal.

- 40 El valor de K_D se calcula en base a la fórmula $Y = B_{\text{máx}} \cdot X / (K_D + X)$ ($B_{\text{máx}}$ = fluorescencia a saturación. X = concentración de anticuerpo. Y = grado de unión).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 110> MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.
- 45 120> MÉTODOS, SISTEMAS Y PRODUCTOS PARA PREDECIR RESPUESTA DE CÉLULAS TUMORALES FRENTE A UN AGENTE TERAPÉUTICO Y TRATAR A UN PACIENTE DE ACUERDO CON LA RESPUESTA PREDICHA
- 50 130> MMJ-009PC
- 140>
- 141>
- 55 150> 61/170.367
- 151> 17-04-2009
- 150> 61/208.206
- 151> 20-02-2009
- 60 150> 61/194.702
- 151> 30-09-2008
- 150> 61/189.053
- 65 151> 15-08-2008

160> 53

170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

15

<400> 1

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

20

<210>2

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 20 25 30
 Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Ile Ile Tyr Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 85 90 95
 Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110

<210>3

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Asn Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210>4

<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

10 <400> 4

```

Gln ser val Leu Thr Gln Pro Pro ser Ala ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1          5          10          15

Arg val Thr Ile ser Cys ser Gly ser Asp ser Asn Ile Gly Arg Asn
          20          25          30

Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
          35          40          45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro ser Gly Val Pro Asp Arg Ile ser
 50          55          60

Gly ser Lys ser Gly Thr ser Ala ser Leu Ala Ile ser Gly Leu Arg
65          70          75          80

ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Gly Thr Trp Asp Asp ser Leu
          85          90          95

ser Gly Pro val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr val Leu
          100          105          110

```

15 <210>5
<211> 122
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 5

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>6

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Tyr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
 85 90 95
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100

105

<210>7
 <211>5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 7

His Tyr Val Met Ala
 1 5

<210>8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 8

Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210>9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5 <400> 9

Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 10
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 10

20 **Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Val Val Ser**
1 5 10

25 <210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 11

Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser
1 5

35 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

45 <400> 12

Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Phe Val Ile
1 5 10

50 <210> 13 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 13

Ala Tyr Asn Met Arg
1 5

5
<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 14

Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 15

Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5

30
<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 16

Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Ile Tyr
1 5 10

40
<210> 17
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 17

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

55 <210> 18

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

10

<400> 18
 Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10

15

<210> 19
 <211>5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 19
 Ala Tyr Gly Met Gly
 1 5

25

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

35

<400> 20
 Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

40

<210> 21
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50

<400> 21
 Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

55

<210>22
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 22

Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val Ser
1 5 10

 $\langle 210 \rangle_{23}$ $\langle 211 \rangle_8$

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 23

Tyr Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser
1 5

 $\langle 210 \rangle_{24}$ $\langle 211 \rangle_9$

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 24

Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
1 5

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 25

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210>26

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 26

Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp
 20 25 30
 Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro
 85 90 95
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

5 <210> 27
 <211>5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 27

Trp Tyr Gly Met Gly
1 5

15 <210>28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 28

25 **Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys**
1 5 10 15
Gly

30 <210>29
 <211>9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 29

Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5

40 <210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

50 <400> 30

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp Ser Leu Asn
1 5 10

55 <210>31
 <211>7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

5
 <400> 31

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
 1 5

10
 <210> 32
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

20
 <400> 32

Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro Phe Thr
 1 5

25
 <210> 33
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Gly Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

35
 <210> 34

<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 34

```

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1      5      10     15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp
20     25     30

Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35     40     45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50     55     60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65     70     75     80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85     90     95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100    105    110

```

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 35

```

Arg Tyr Gly Met Trp
1      5

```

<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 36

Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

5 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 37

Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

15 <210> 38
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 25 <400> 38

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp Asn Ile Val Ser
1 5 10

30 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 39

Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

40 <210> 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 50 <400> 40

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
1 5 10

5 <210>41
<211> 1095
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético"

<400> 41

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Asn Arg Asp Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Arg Gly Val Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala
 130 135 140
 Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly
 145 150 155 160
 Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 165 170 175
 His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Ser Asp Arg
 180 185 190
 Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr
 195 200 205
 Ala Ser Leu Ile Ile Ser Gly Leu Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Ser Ser Tyr Gly Ser Ser Ser Thr His Val Ile Phe Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Ala Ala Ser Asp Ala His Lys Ser
 245 250 255

Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala
 260 265 270
 Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Ser Pro Phe Glu
 275 280 285
 Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys
 290 295 300
 Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
 305 310 315 320
 Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly
 325 330 335
 Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys
 340 345 350
 Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg
 355 360 365
 Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr
 370 375 380
 Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe
 385 390 395 400
 Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe
 405 410 415
 Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys
 420 425 430
 Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg
 435 440 445
 Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala
 450 455 460
 Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala
 465 470 475 480
 Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys
 485 490 495
 Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala
 500 505 510
 Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu
 515 520 525

Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val
 530 535 540
 Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe
 545 550 555 560
 Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val
 565 570 575
 Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr
 580 585 590
 Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu
 595 600 605
 Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val
 610 615 620
 Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys
 625 630 635 640
 Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn
 645 650 655
 Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro
 660 665 670
 Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys
 675 680 685
 Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu
 690 695 700
 Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val
 705 710 715 720
 Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg
 725 730 735
 Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu
 740 745 750
 Phe Gln Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser
 755 760 765
 Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val
 770 775 780
 Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp
 785 790 795 800

Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu
 805 810 815
 Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala
 820 825 830
 Ala Leu Gly Leu Ala Ala Ala Leu Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly
 835 840 845
 Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly
 850 855 860
 Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met
 865 870 875 880
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Met Gly Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser
 885 890 895
 Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val
 900 905 910
 Asp Lys Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Pro
 915 920 925
 Ser Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg His Asp Val Gly Tyr Cys
 930 935 940
 Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp Pro Glu Trp Leu Gly Val Trp Gly
 945 950 955 960
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Gly
 965 970 975
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro
 980 985 990
 Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly
 995 1000 1005
 Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln
 1010 1015 1020
 Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp His Thr Asn
 1025 1030 1035
 Arg Pro Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 1040 1045 1050
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Phe Arg Ser Glu Asp Glu
 1055 1060 1065

Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu Ser Gly Trp
1070 1075 1080

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
1085 1090 1095

5 <210> 42
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 42

Ser Tyr Trp Met Ser
1 5

15 <210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

25 <400> 43

Asn Ile Asn Arg Asp Gly Ser Ala Ser Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 44

Asp Arg Gly Val Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5

40 <210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>

<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 45

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Phe Val Ser
1 5 10

5 <210>46
<211>7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 46

Asp Val Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

15 <210> 47
<211> 11
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
25 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 47

Ser Ser Tyr Gly Ser Ser Ser Thr His Val Ile
1 5 10

30 <210>48
<211>5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 48

Ser Tyr Trp Ile Ala
1 5

45 <210>49
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
50 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"

<400> 49

Leu Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Lys Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

55 Gly

5 <210>50
 <211>20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 50

 His Asp Val Gly Tyr Cys Thr Asp Arg Thr Cys Ala Lys Trp Pro Glu
 1 5 10 15

 Trp Leu Gly Val
 20

 15 <210> 51
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 51

 25 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

 30 <210> 52
 <211>7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 52

 Asp His Thr Asn Arg Pro Ala
 1 5

 40 <210> 53
 <211>11

 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

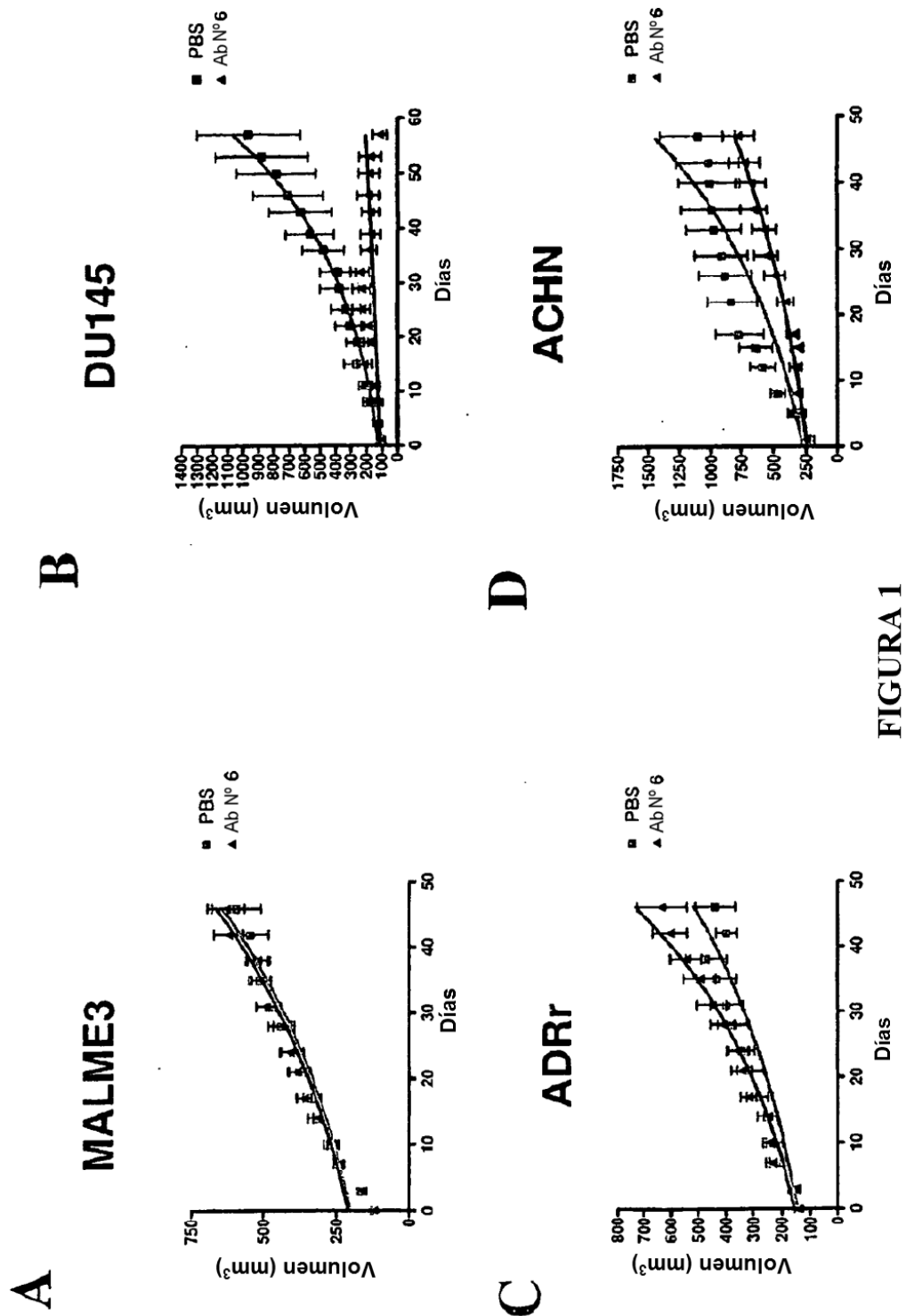
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Péptido sintético"
 <400> 53

 Ala Ser Trp Asp Tyr Thr Leu Ser Gly Trp Val
 1 5 10

55

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método para tratar un paciente que tiene un tumor neoplásico, comprendiendo dicho método administrar el anticuerpo anti-ErbB3 al paciente si el nivel de ErbB3 fosforilado (pErbB3) en una muestra del tumor obtenido a partir del paciente se determina que no es menor de 0,064 pg/μg de proteína total.
2. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tumor es un tumor maligno de un órgano seleccionado entre colon, pulmón, recto, vesícula biliar, cerebro, médula espinal, mama, riñón, páncreas, estómago, hígado, hueso, piel, bazo, ovario, testículo, próstata y músculo.
3. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo anti-ErbB3 comprende al menos uno de:
 - (i) un anticuerpo que tiene las secuencias de región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L) mostradas en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 7-9 y 10-12, respectivamente;
 - (ii) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 3 y 4, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 13-15 y 16-18, respectivamente;
 - (iii) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 5 y 6, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 19-21 y 22-24, respectivamente;
 - (iv) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 25 y 26, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 27-29 y 30-32, respectivamente; y
 - (v) un anticuerpo que tiene las secuencias de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 33 y 34, respectivamente o un anticuerpo que comprende las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 35-37 y 38-40, respectivamente.
4. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo anti-ErbB3 comprende un anticuerpo que tiene las secuencias de región variable de cadena pesada (V_H) y región variable de cadena ligera (V_L) mostradas en SEC ID N°: 1 y 2, respectivamente o un anticuerpo que tiene las secuencias de CDR de V_H y V_L mostradas en SEC ID N°: 7-9 y 10-12, respectivamente.
5. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,08 pg/μg de proteína total.
6. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,096 pg/μg de proteína total.
7. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,122 pg/μg de proteína total.
8. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,128 pg/μg de proteína total.
9. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,144 pg/μg de proteína total.
10. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el nivel de pErbB3 en la muestra se determina que es no menor de 0,16 pg/μg de proteína total.
11. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el tumor es un tumor maligno de mama.
12. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el tumor es un tumor maligno de colon.
13. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el tumor es un tumor maligno de pulmón.
14. Un anticuerpo anti-ErbB3 para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el tumor es un tumor maligno de recto o páncreas.



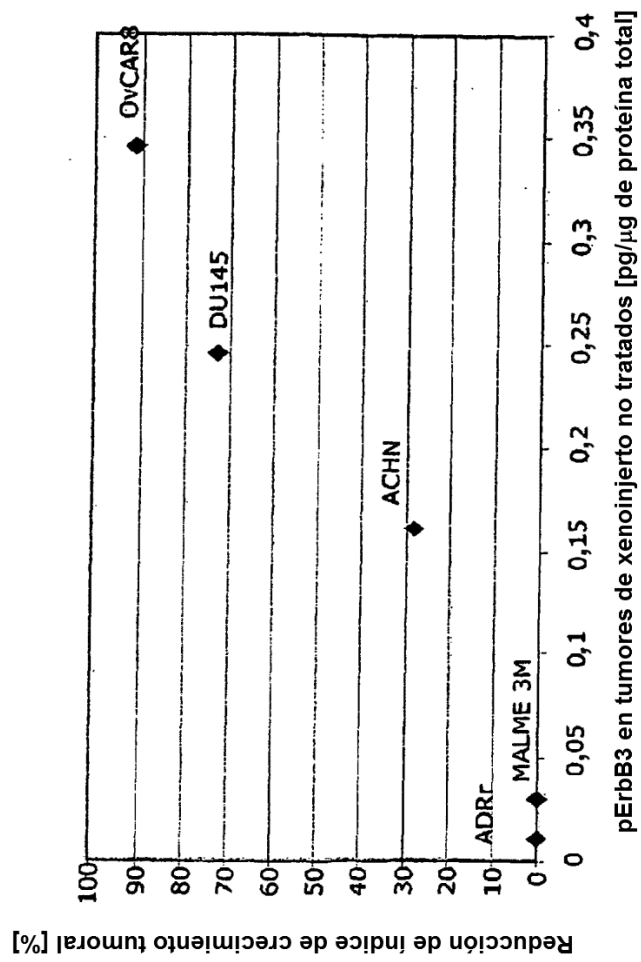


FIGURA 2

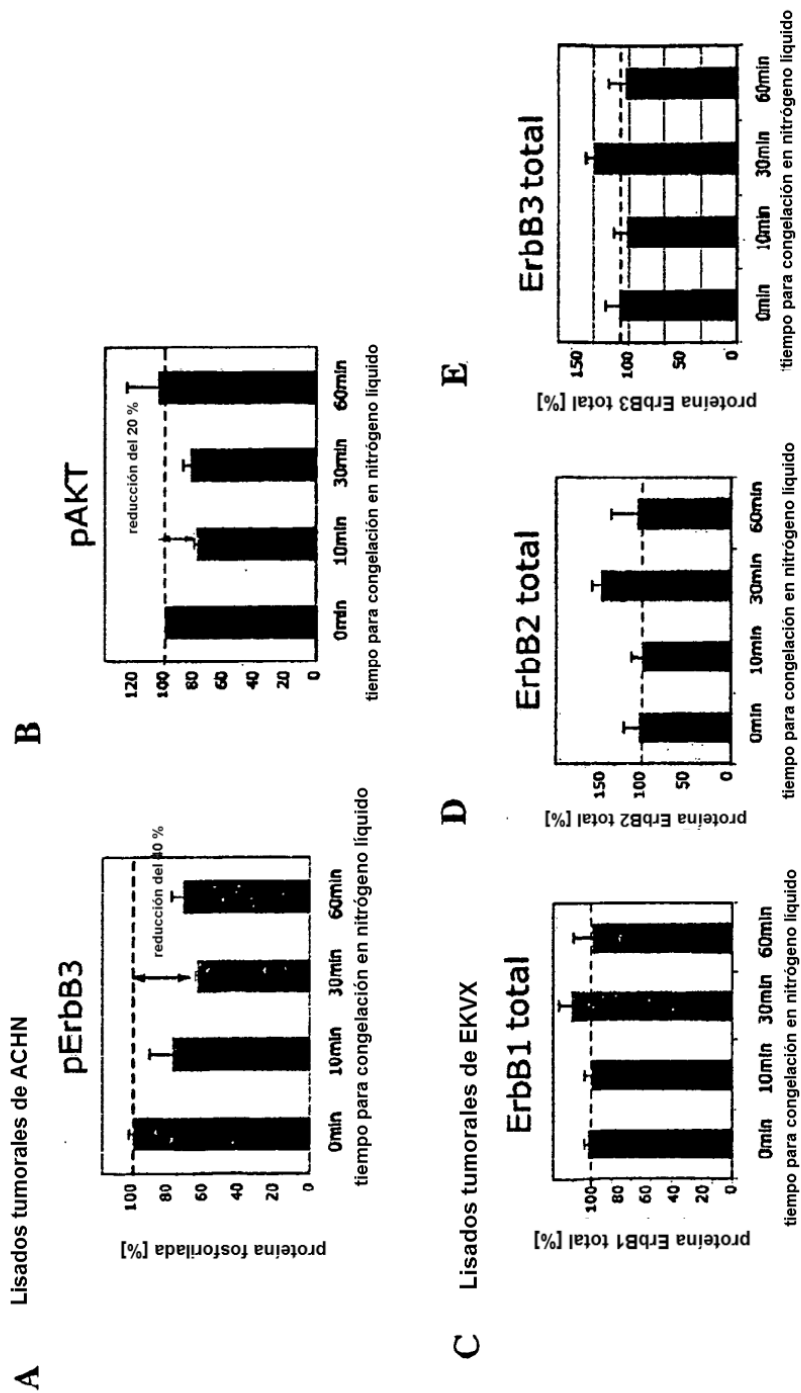


FIGURA 3

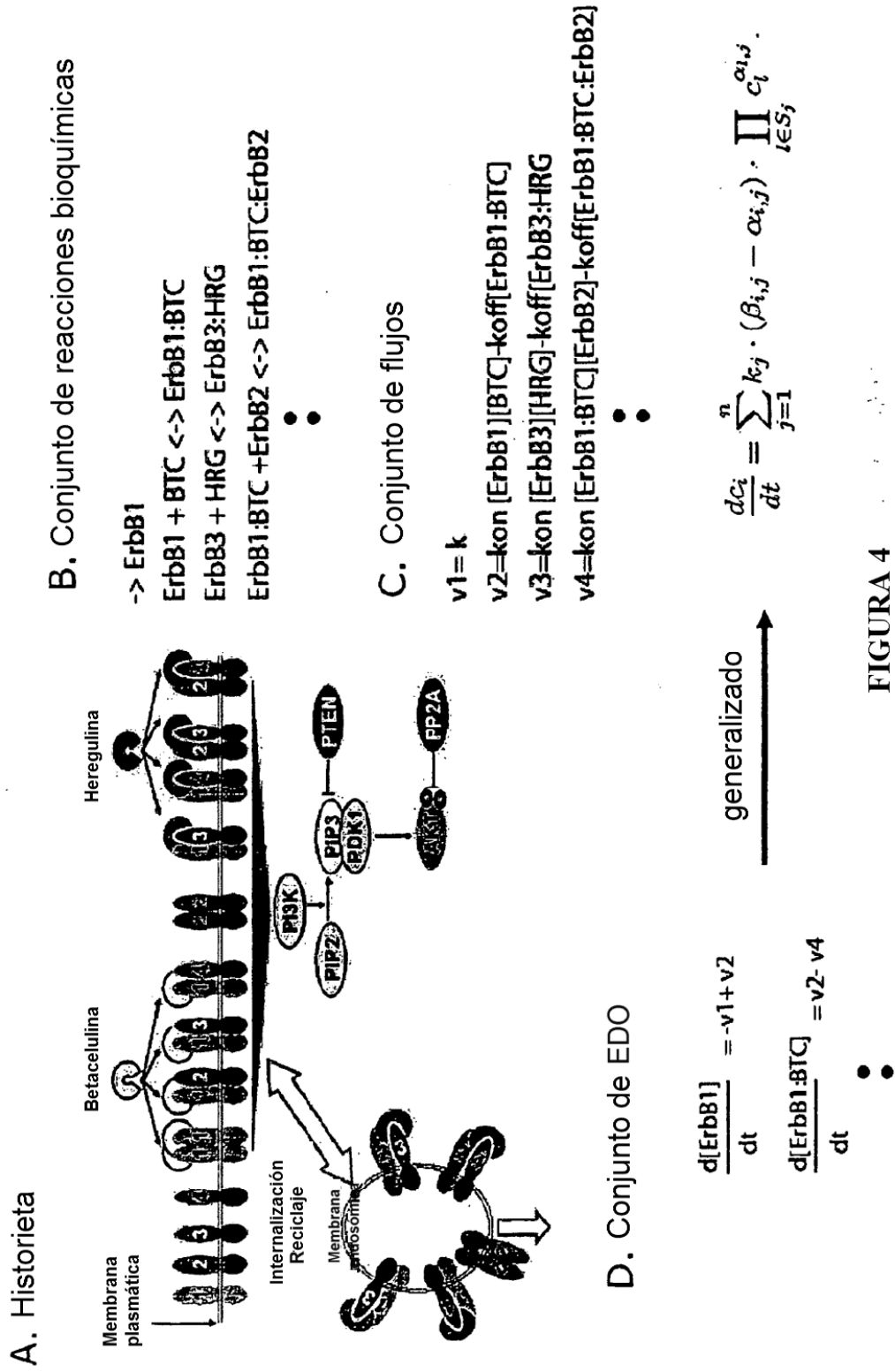


FIGURA 4

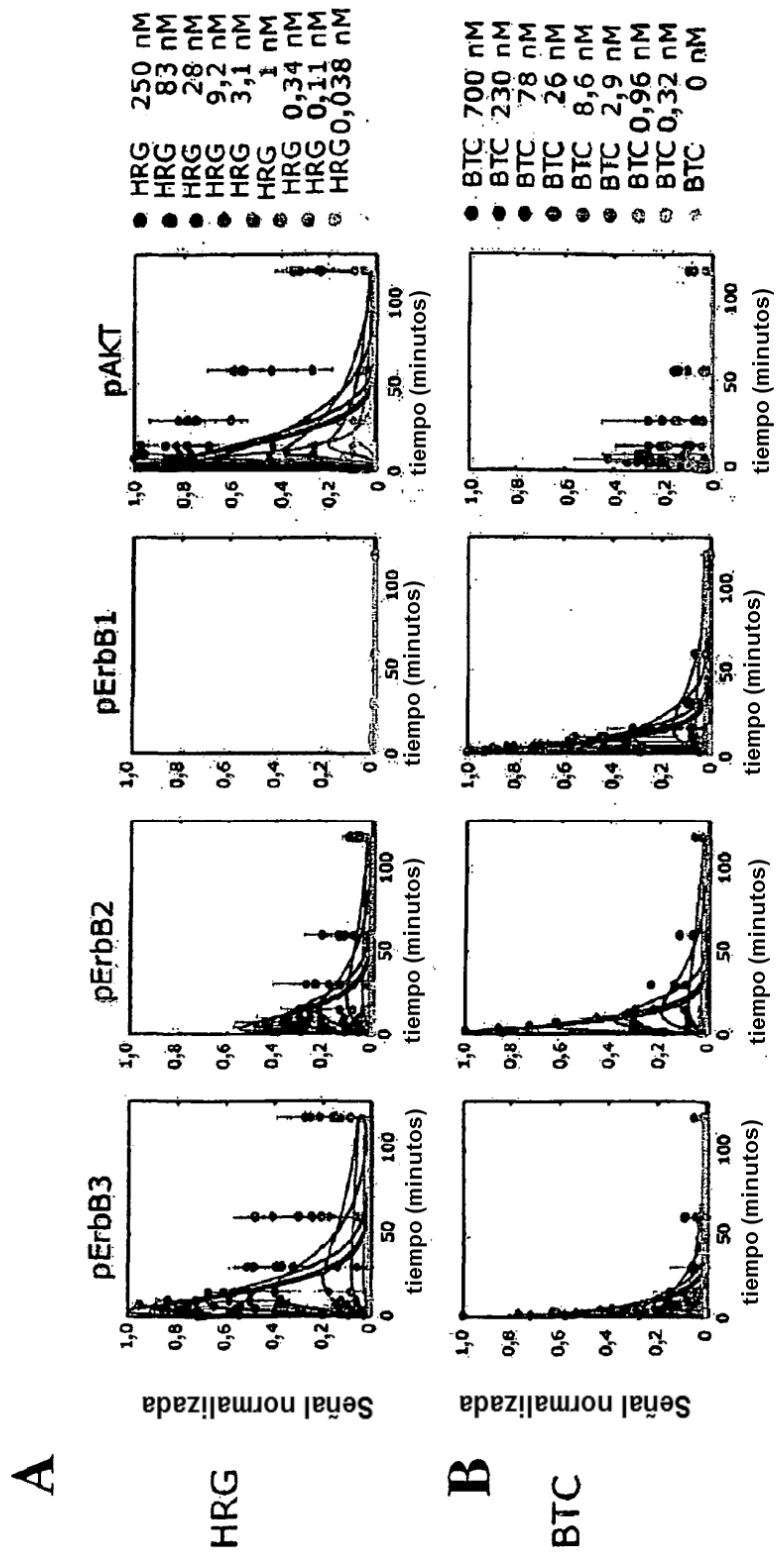


FIGURA 5

Sensibilidad de pErbB3 frente a niveles de especies en el modelo computacional

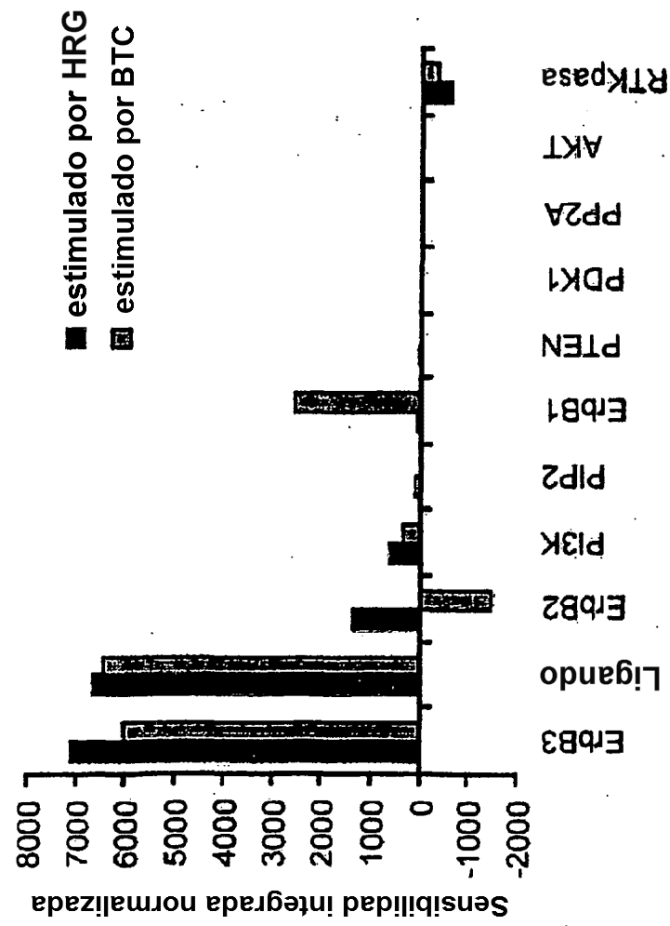


FIGURA 6

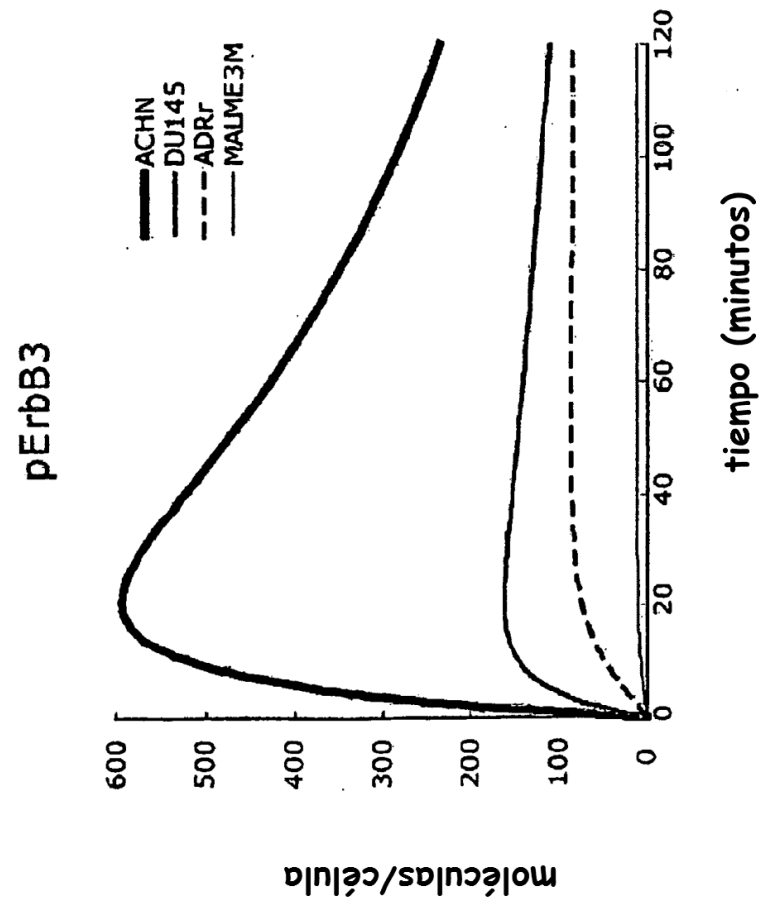


FIGURA 7

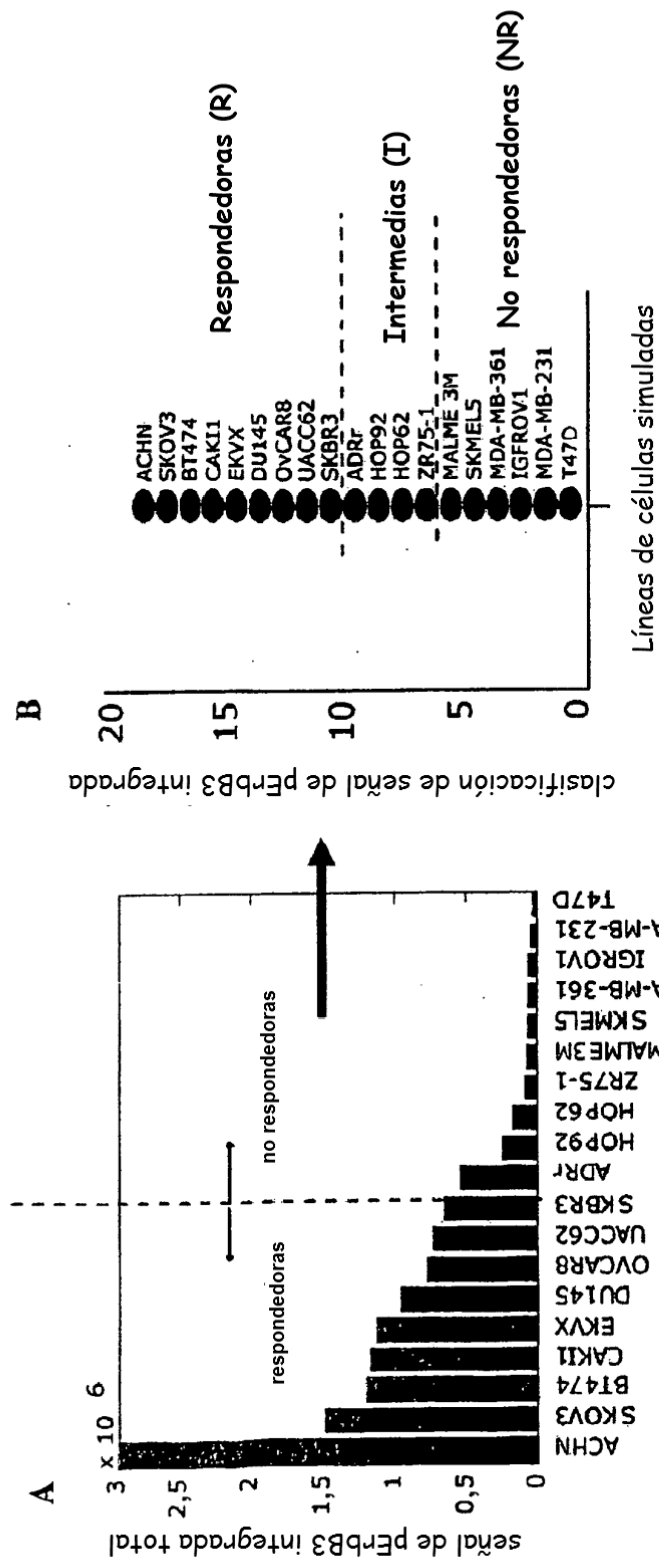


FIGURA 8

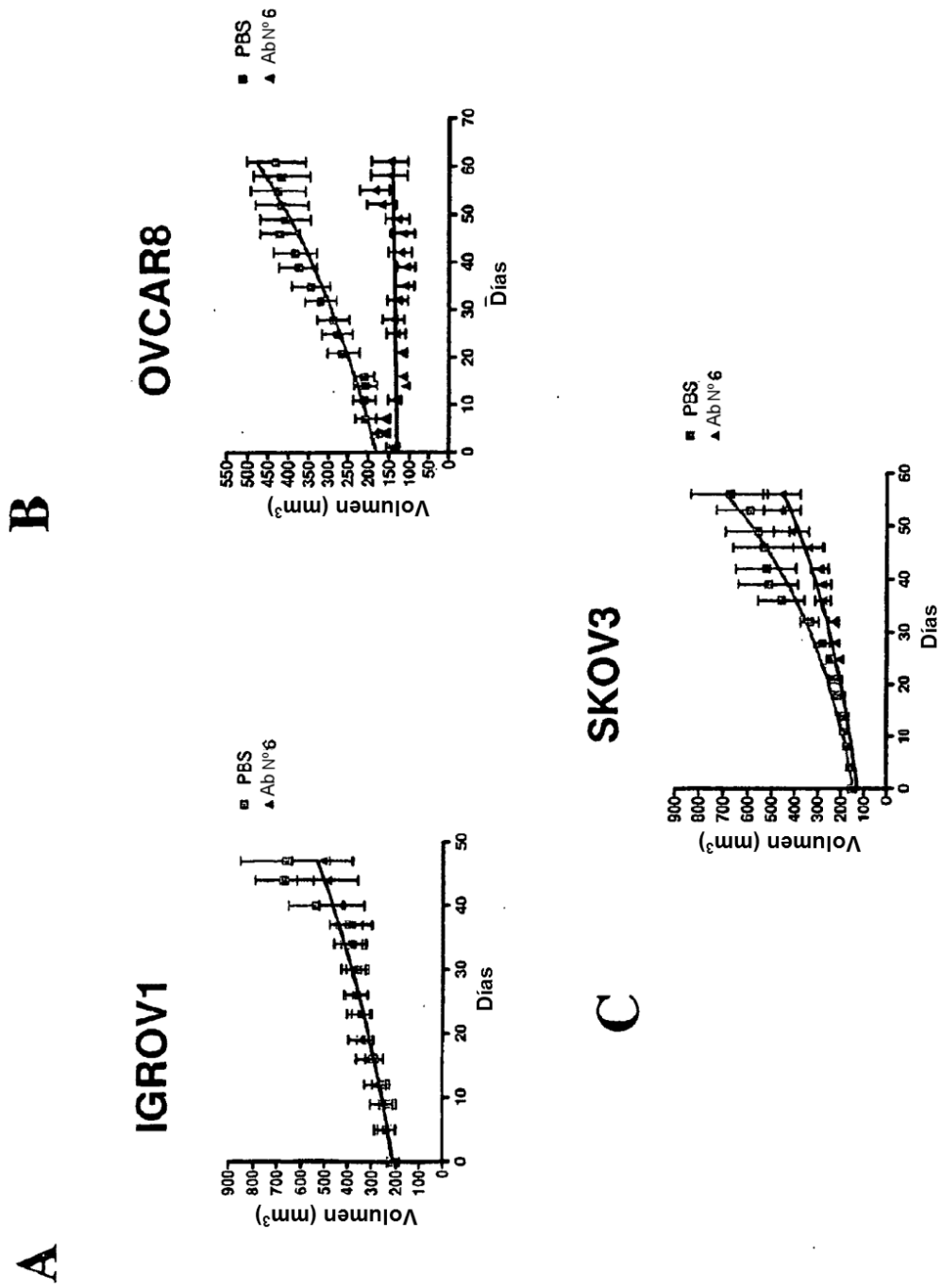
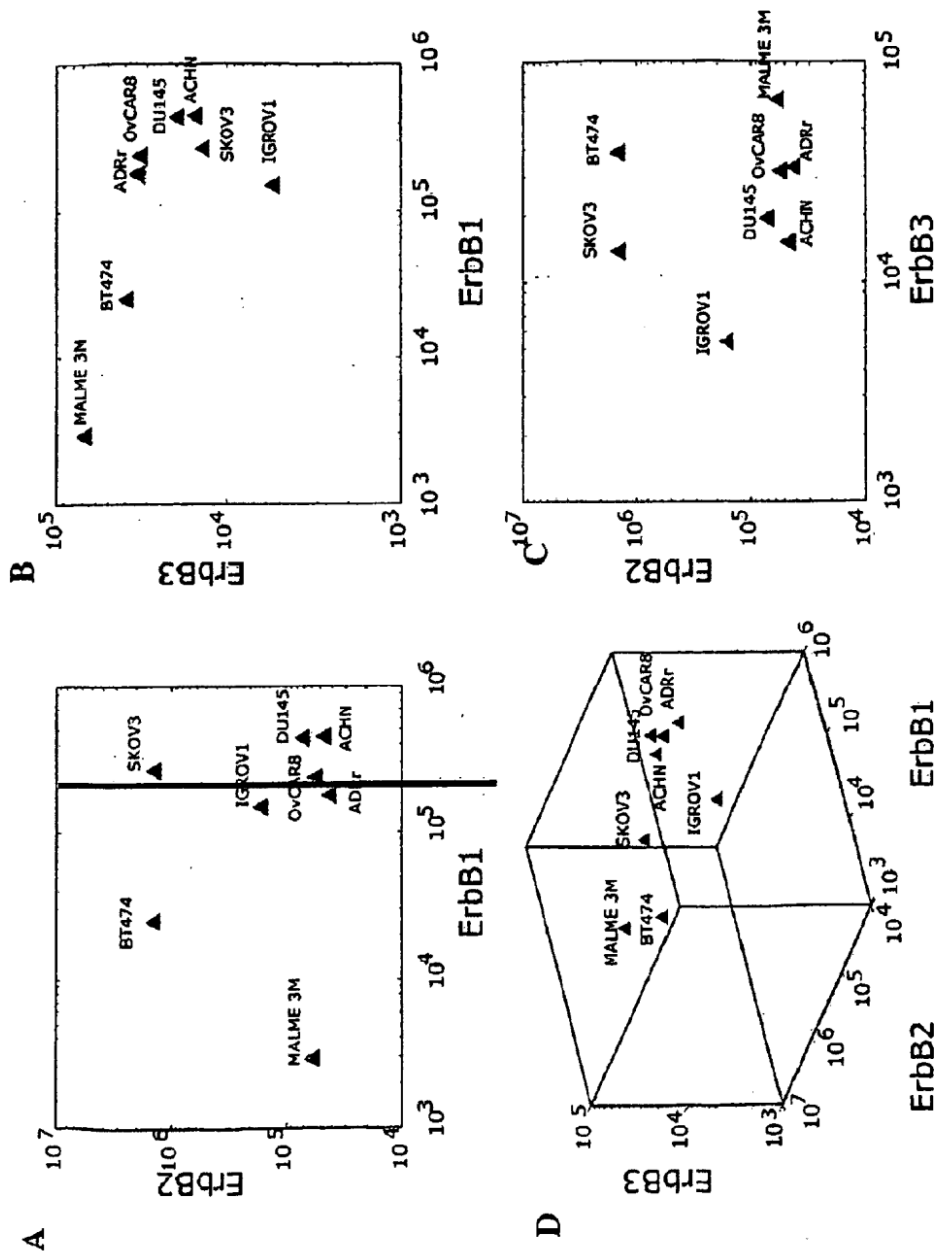
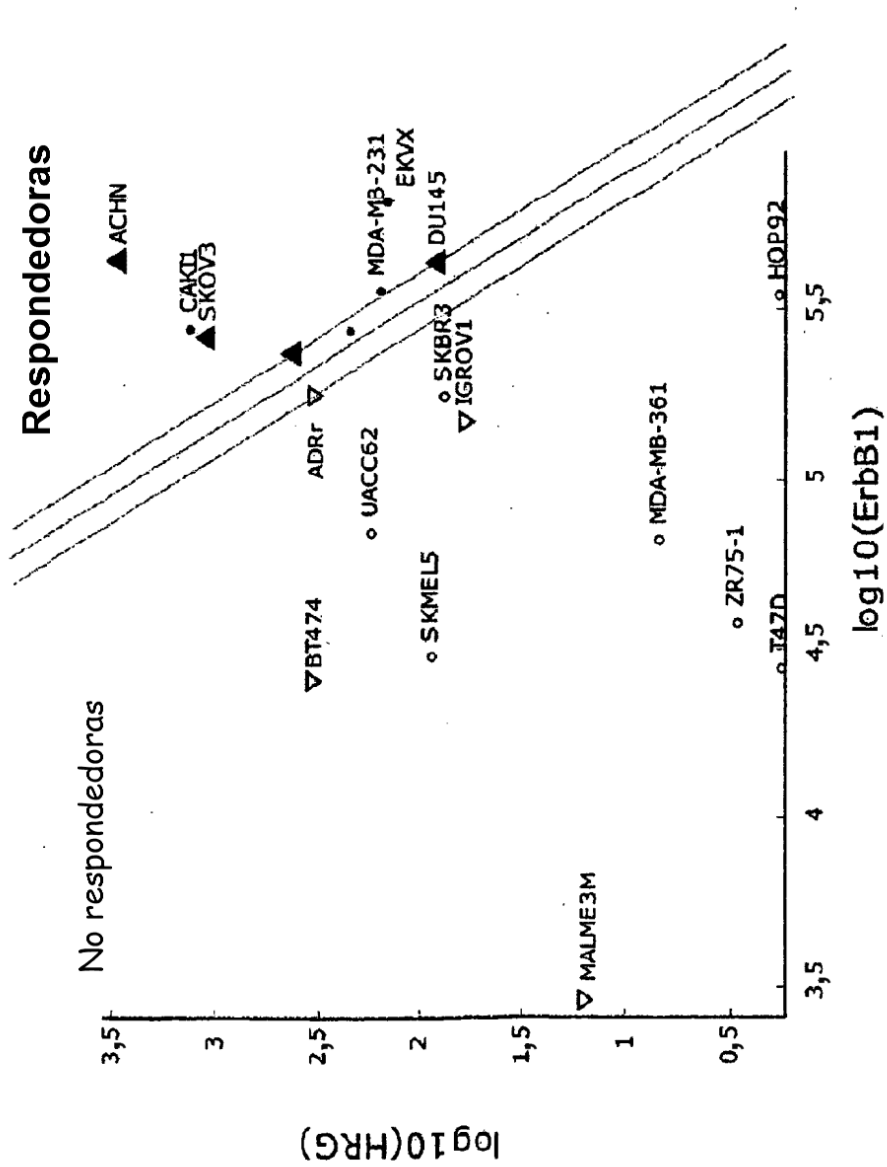


FIGURA 9



$\blacktriangle$ Respondedoras $\triangle$ No respondedoras

FIGURA 10



- ▲ respondedora de estudio de xenoinjerto llevado a cabo
- ▽ no respondedora de estudio de xenoinjerto llevado a cabo
- respondedora de estudio de xenoinjerto predicho
- no respondedora de estudio de xenoinjerto predicho

FIGURA 11

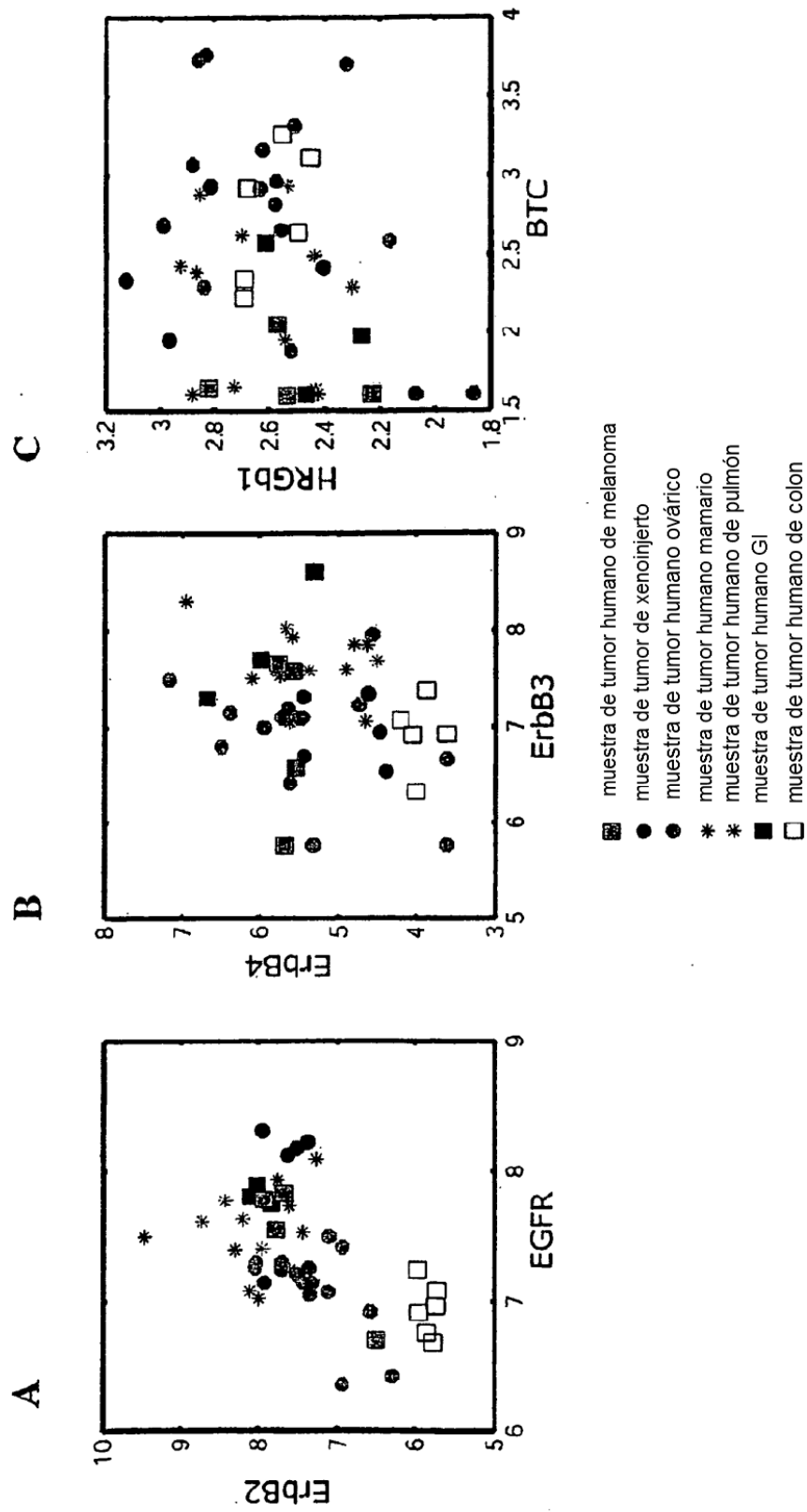


FIGURA 12

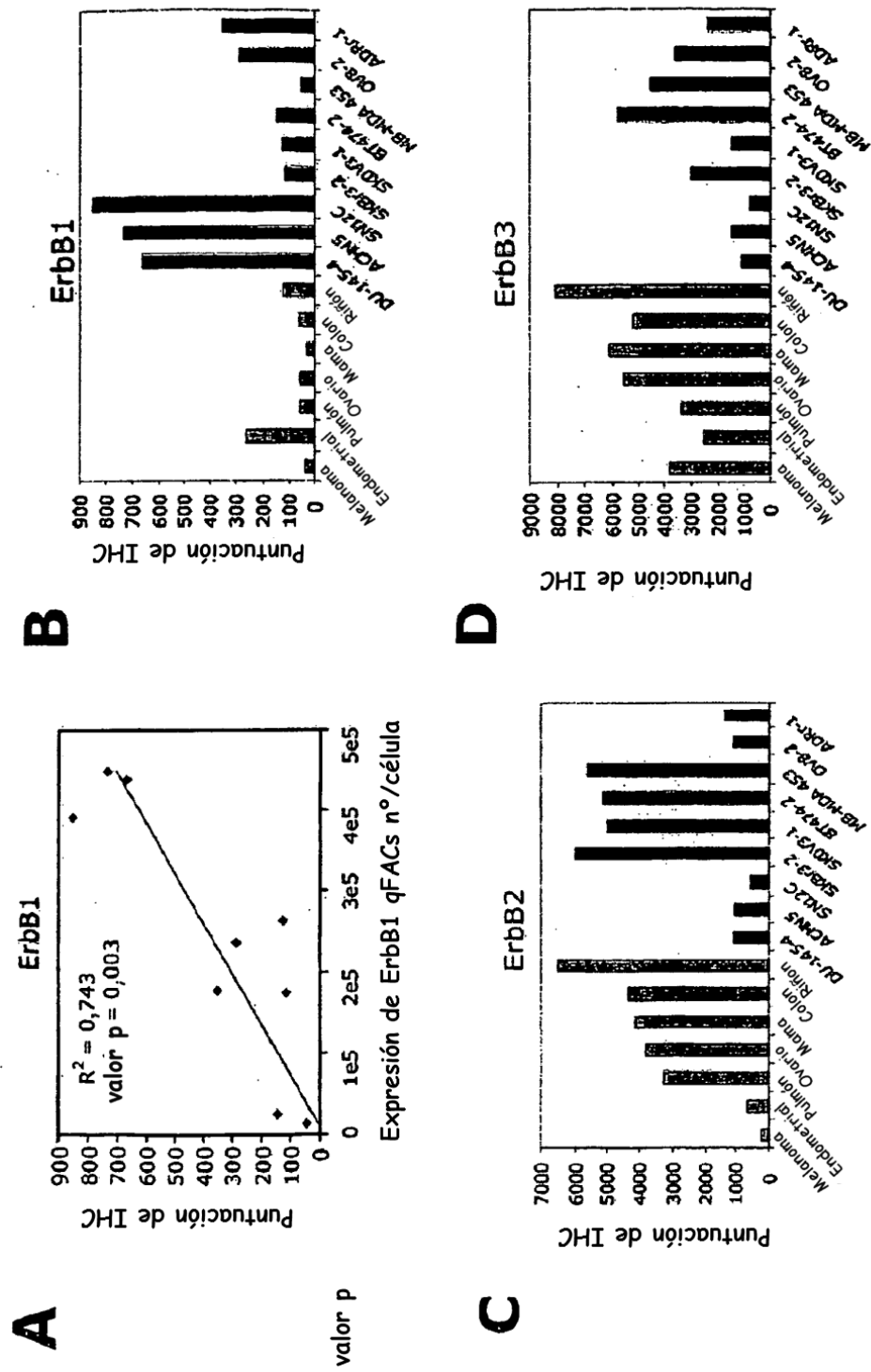
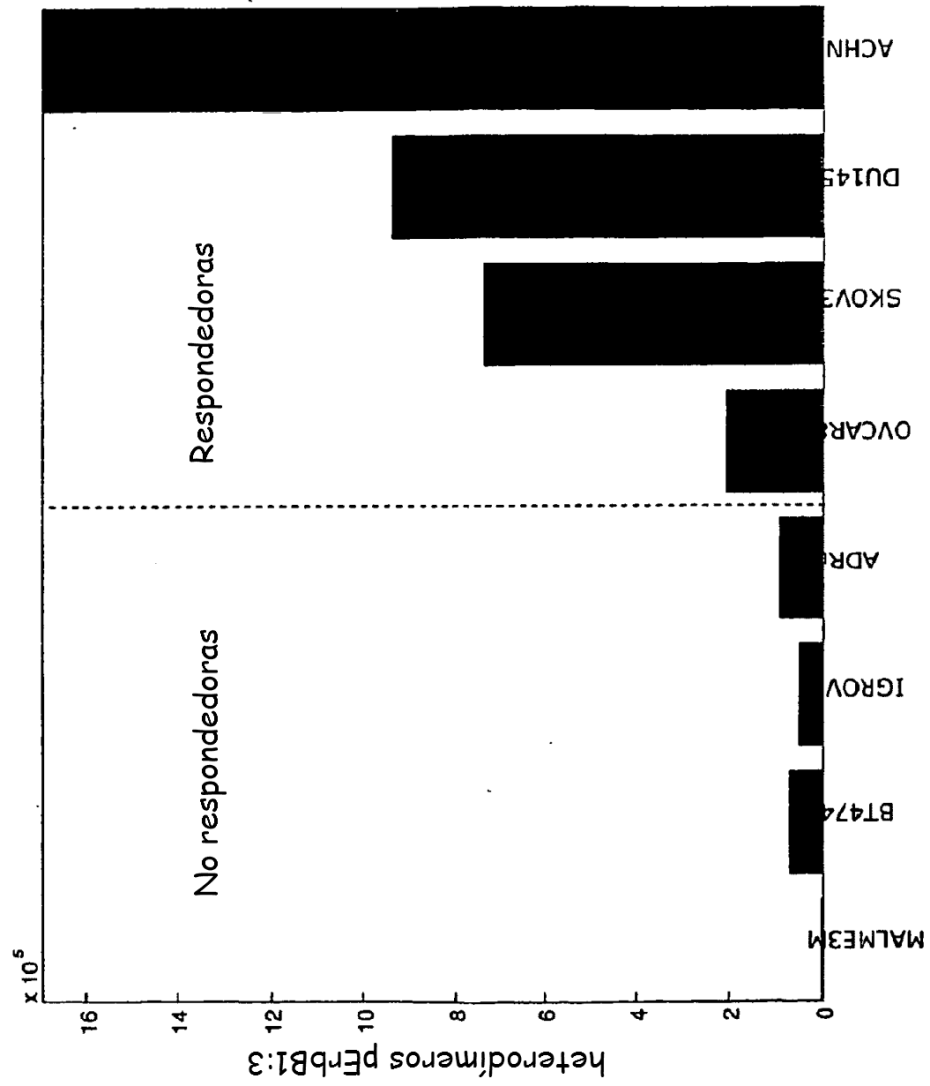


FIGURA 13

FIGURA 14



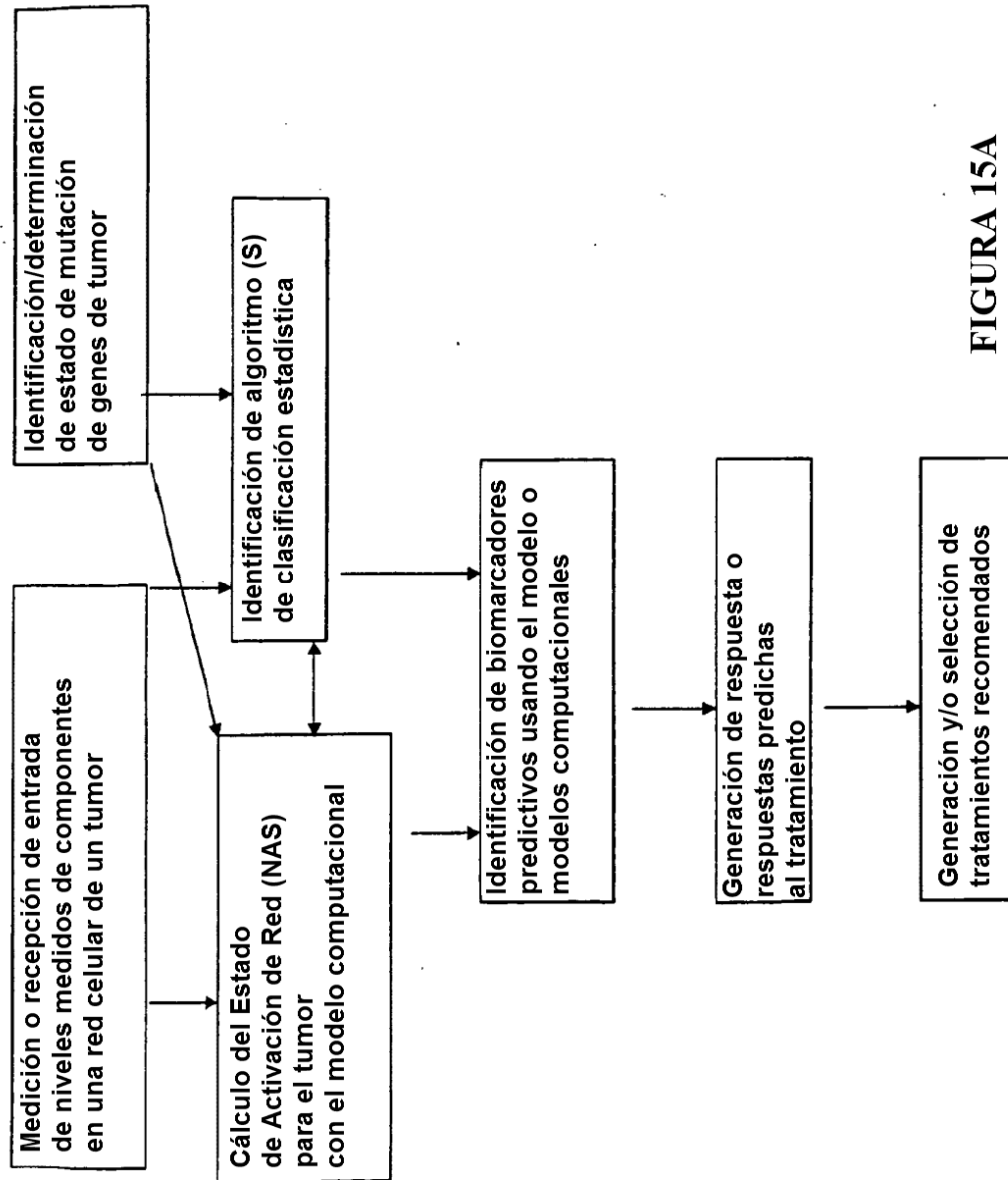


FIGURA 15A

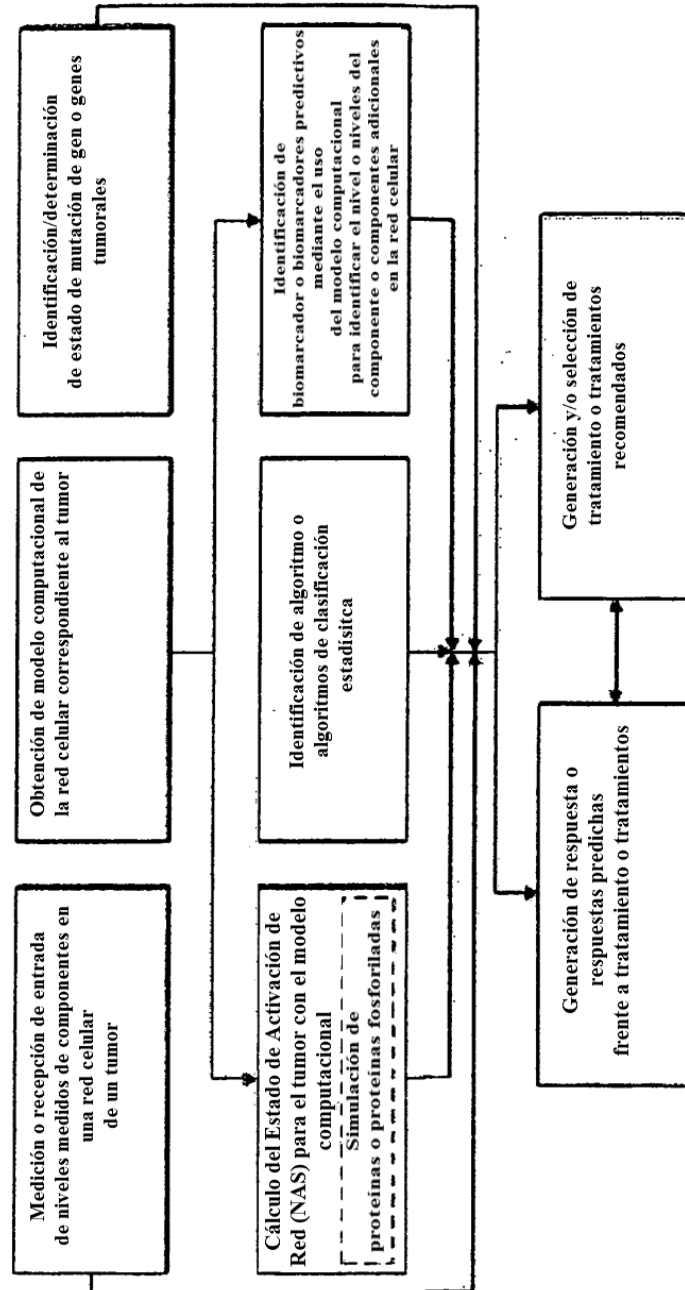


FIGURA 15B

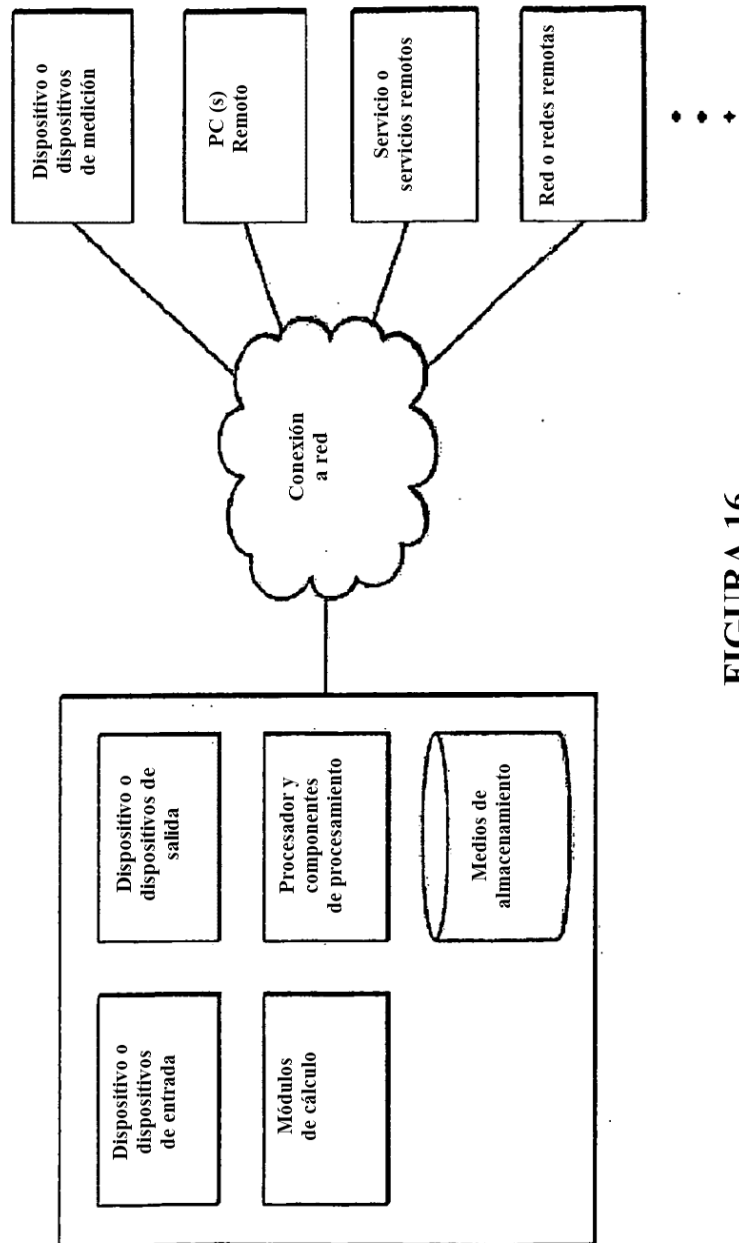


FIGURA 16

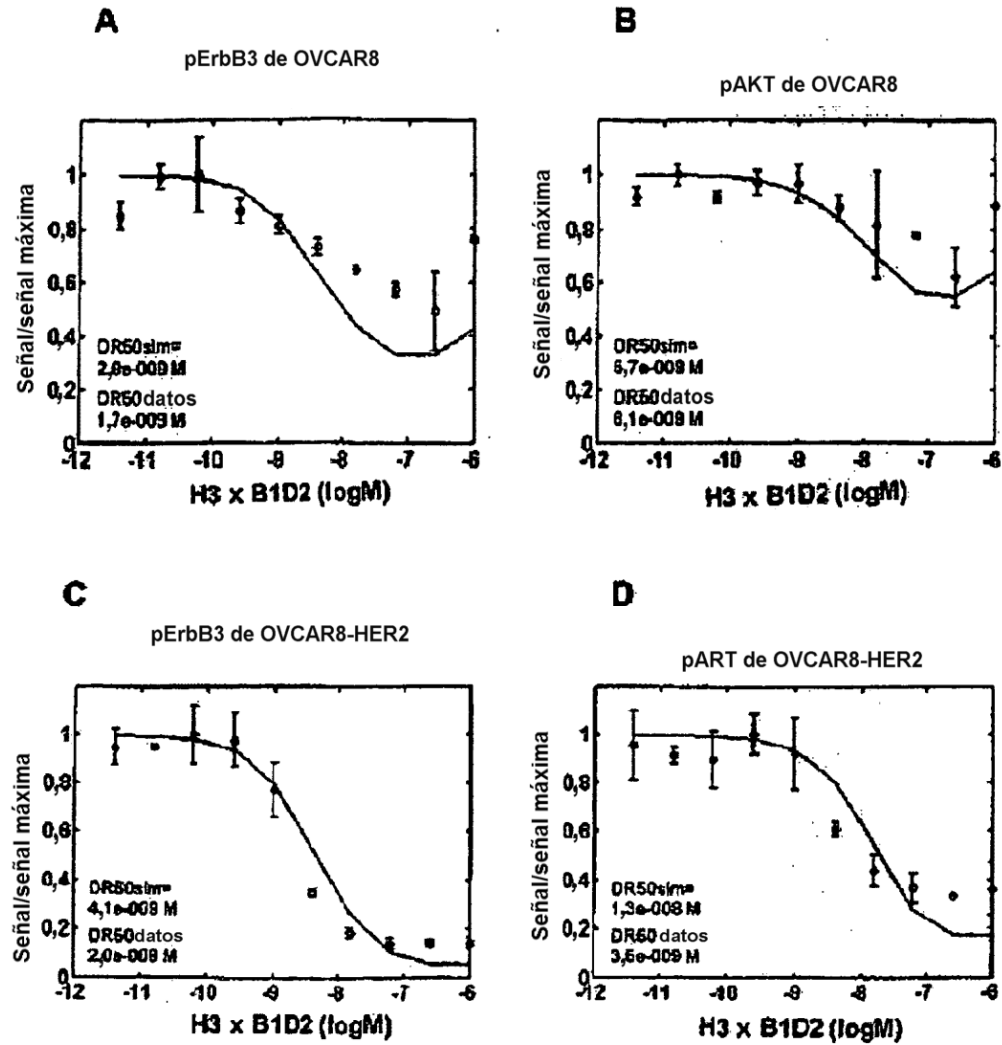


FIGURA 17

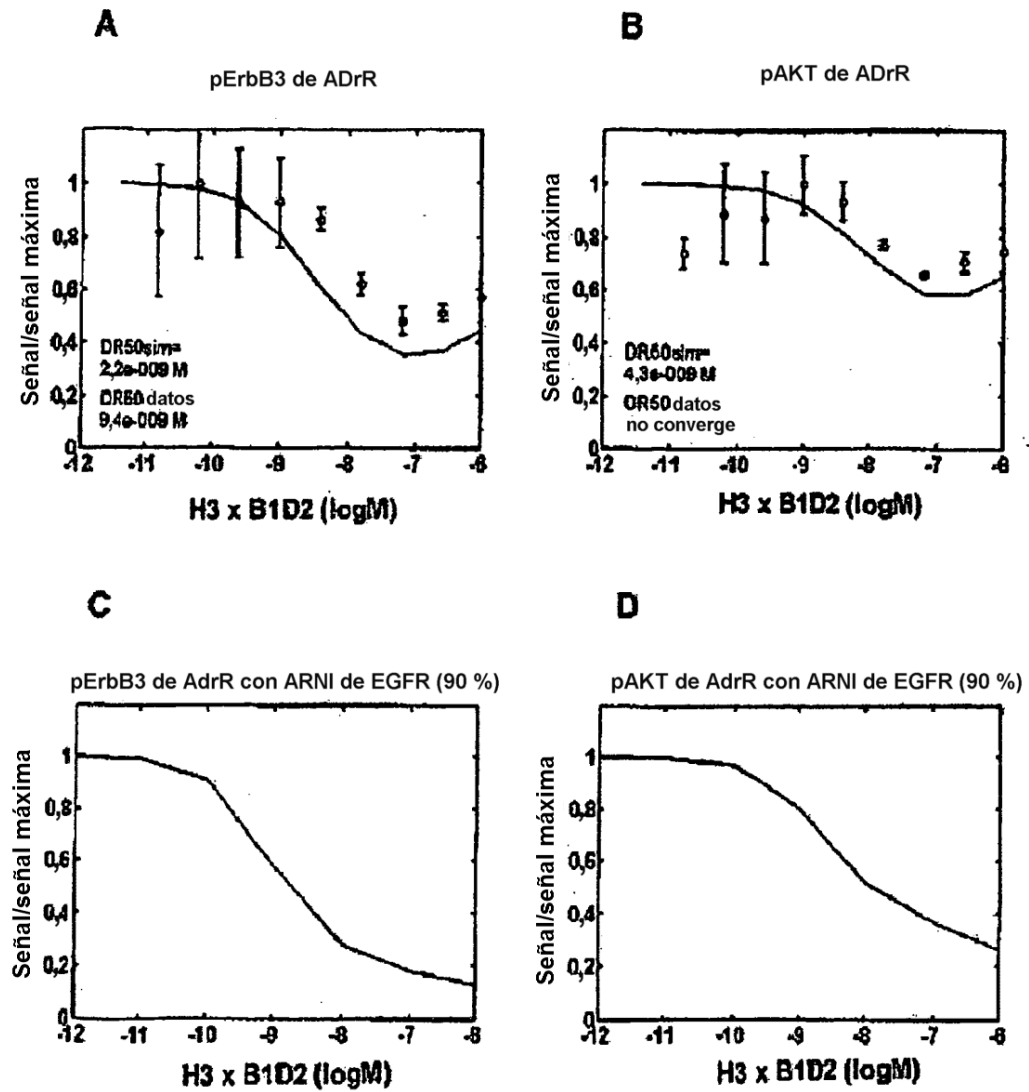


FIGURA 18

Índice de Crecimiento Relativo frente a Monómeros E2

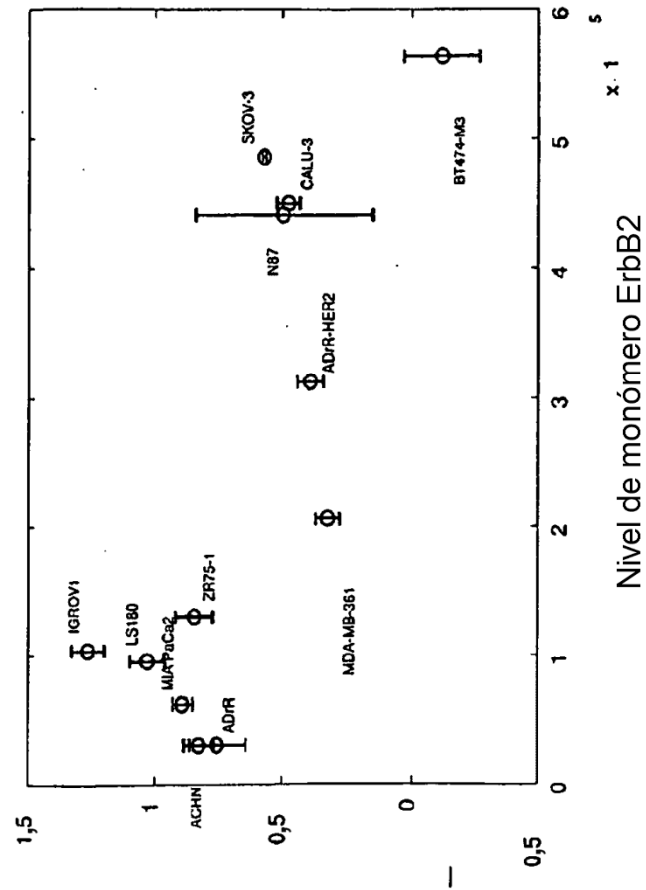


FIGURA 19A

Índice de crecimiento relativo frente a homodímeros E2

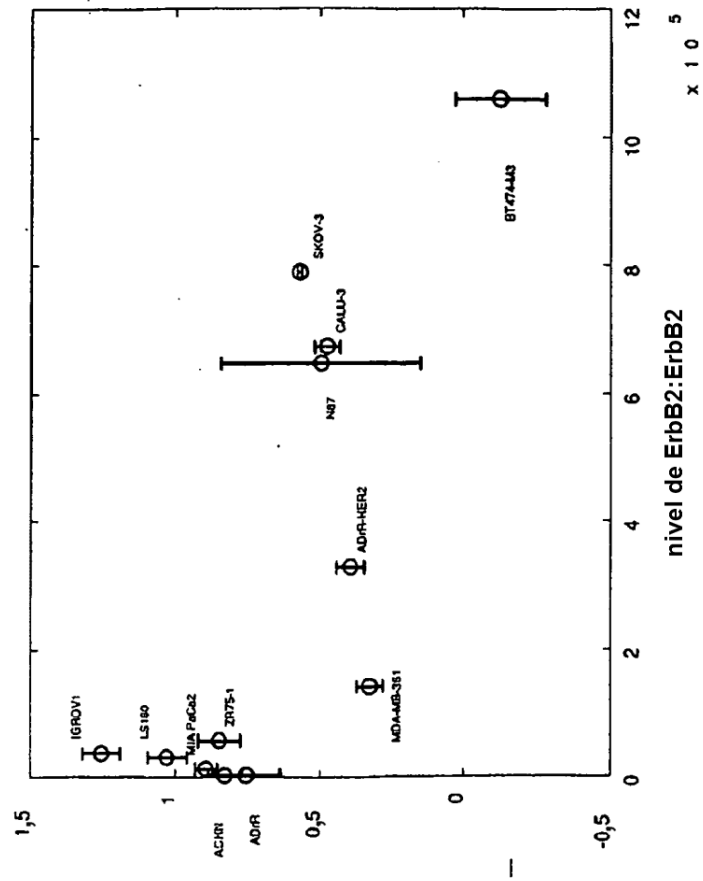
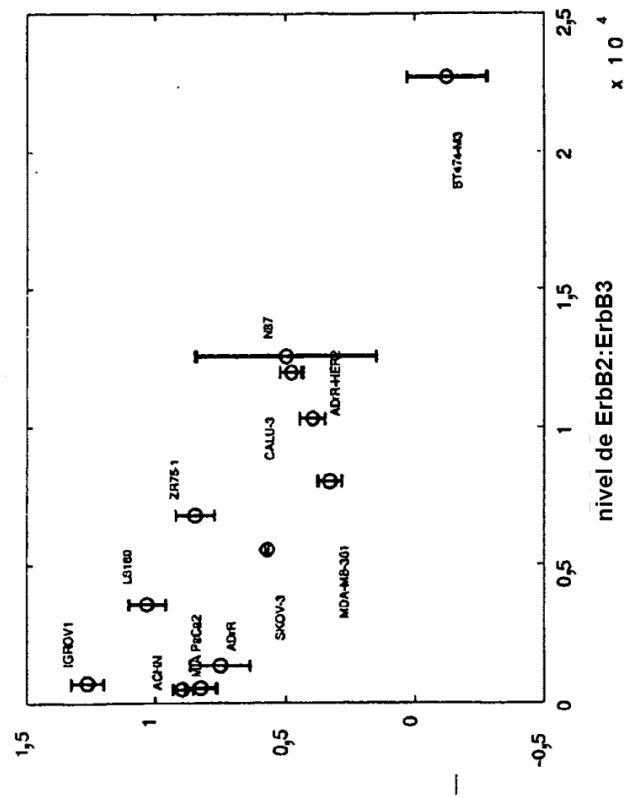


FIGURA 19B

Índice de crecimiento relativo frente a dímeros E2:E3



Índice de crecimiento relativo frente a E1:E3 relativo

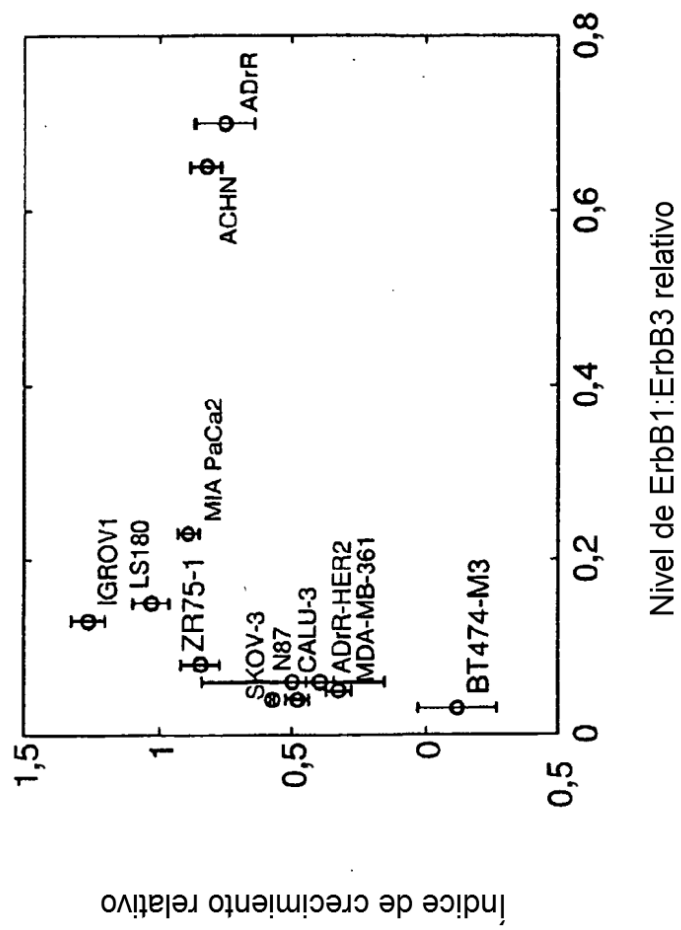


FIGURA 20A

Índice de crecimiento relativo frente a E2:E3 relativo

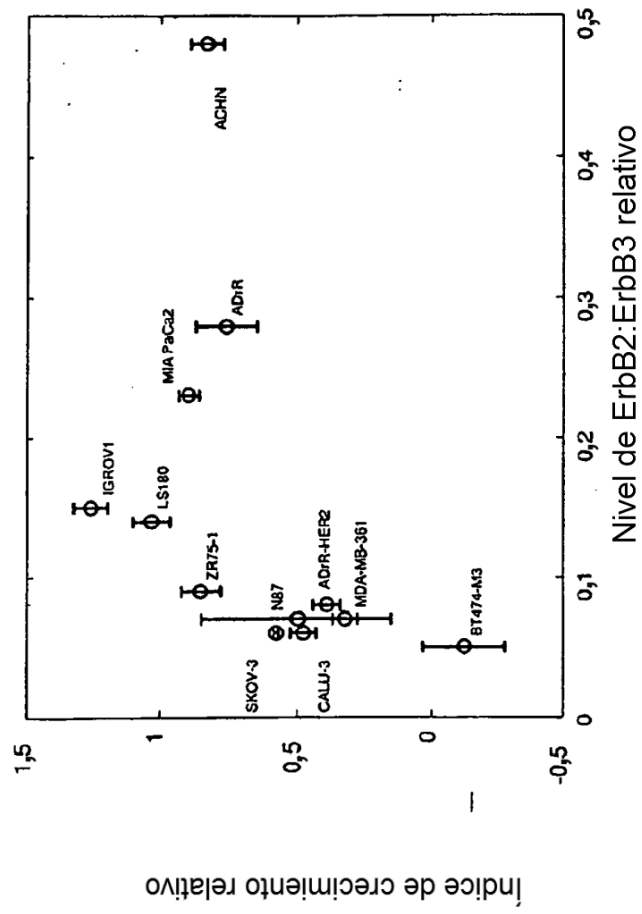


FIGURA 20B

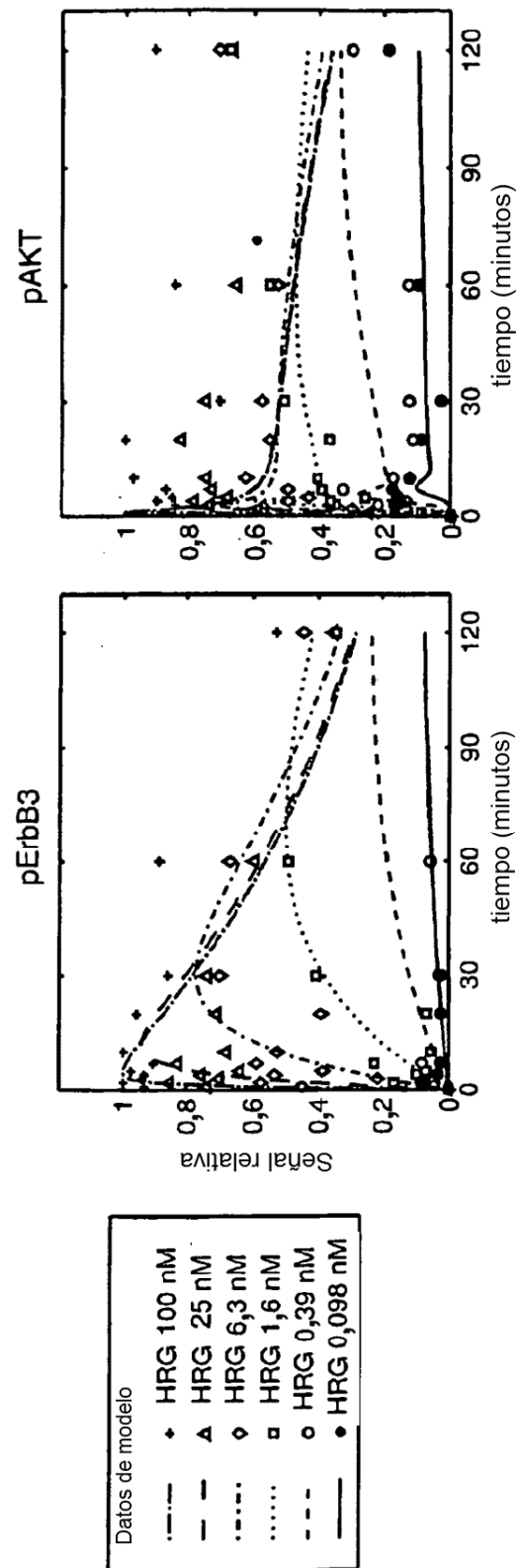


Figura 21