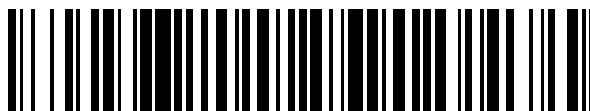


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 211**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008 E 08781680 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2179291**

54 Título: **Selección de fármacos para la terapia del cáncer de pulmón utilizando matrices basadas en anticuerpos**

30 Prioridad:

13.07.2007 US 949820 P

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

08.01.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SINGH, SHARAT y
HARVEY, JEANNE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 526 211 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

Selección de fármacos para la terapia del cáncer de pulmón utilizando matrices basadas en anticuerpos

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El proceso de transducción de señales en las células es responsable de una diversidad de funciones biológicas, entre ellas la división y muerte celular, el metabolismo, la activación de las células inmunológicas, la neurotransmisión y la percepción sensorial, entre otras muchas. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los trastornos en la transducción normal de señales en las células pueden conducir a varios estados patológicos, tales como la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la autoinmunidad y el cáncer.

15 Una ruta de transducción de señales bien caracterizada es la ruta de la MAP quinasa, que es responsable de la transducción de la señal del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de estimulación de la proliferación celular en las células (ver figura 1). El EGF se une a una tirosina quinasa unida a receptor transmembranal, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que resulta activado por la unión del EGF. La unión de EGF al EGFR activa la actividad de tirosina quinasa del dominio citoplasmático del receptor. Una consecuencia de esta activación de quinasa es la autofosforilación del EGFR en los residuos de tirosina. Los residuos de tirosina fosforilada en el EGFR activado proporcionan un sitio de anclaje para la unión de proteínas adaptadoras que contienen dominio SH2, tales como GRB2. En su función de adaptador, GRB2 se une además a un factor de intercambio de nucleótidos guanina, SOS, mediante un dominio SH3 en GRB2. La formación del complejo EGFR-GRB2-SOS conduce a la activación de SOS del factor de intercambio de nucleótidos de guanina, que estimula la eliminación de GDP de Ras. Tras la eliminación de GDP, Ras se une a GTP y resulta activado.

25 Tras la activación, Ras se une y activa la actividad de proteína quinasa de la RAF quinasa, una proteína quinasa específica de serina/treonina. A continuación se activa una cascada de proteínas quinasas que conduce a la proliferación celular. En líneas generales, la RAF quinasa fosforila y activa la MEK, otra serina/treonina quinasa. La MEK activada fosforila y activa la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Entre las dianas para la fosforilación adicional por la MAPK se encuentran la proteína ribosómica 40S quinasa S6 (RSK). La fosforilación de la RSK por la MAPK resulta en la activación de RSK, que a su vez fosforila la proteína ribosómica S6. Otra diana conocida de la MAPK es el protooncogén c-Myc, un gen importante para la proliferación celular que se encuentra mutado en una diversidad de cánceres. MAPK también fosforila y activa otra proteína quinasa, MNK, que a su vez fosforila el factor de transcripción CREB. Indirectamente, MAPK regula además la transcripción del gen Fos, que codifica todavía otro factor de transcripción que participa en la proliferación celular. Mediante la alteración de los niveles y actividades de dichos factores de transcripción, MAPK transduce la señal extracelular originaria del EGF llevando a una transcripción alterada de genes que resultan importantes para la progresión del ciclo celular.

40 Dada la función crucial que desempeñan las rutas de transducción de señales en el crecimiento celular, no sorprende que muchos cánceres aparezcan como resultado de mutaciones y otras alteraciones en componentes de la transducción de señales que resultan en la activación aberrante de las rutas de proliferación celular. Por ejemplo, la sobreexpresión o hiperactividad de EGFR se ha asociado a varios cánceres, incluyendo el glioblastoma multiforme, el cáncer de colon y el cáncer de pulmón. Esto ha impulsado el desarrollo de terapéuticas anticáncer dirigidas contra EGFR, incluyendo el gefitinib y el erlotinib para el cáncer de pulmón, y el cetuximab para el cáncer de colon.

45 El cetuximab es un ejemplo de un inhibidor de anticuerpos monoclonales, el cual se une al dominio del EGFR de unión a ligandos extracelulares, impidiendo de esta manera la unión de ligandos que activan la EGFR tirosina quinasa. En contraste, el gefitinib y el erlotinib son moléculas pequeñas que inhiben la EGFR tirosina quinasa de localización intracelular. En ausencia de actividad de quinasa, el EGFR no puede autofosforilarse en los residuos de tirosina, lo que es un requisito previo para la unión de proteínas adaptadoras posteriores, tales como GRB2. Al detener la cascada de señalización en las células basadas en esta ruta para el crecimiento, se reducen la proliferación y migración tumoral.

50 Además, otros estudios han demostrado que aproximadamente 70% de los melanomas humanos y una fracción menor de otros tumores presentan una mutación puntual (V599E) en el gen Raf que conduce a la activación persistente de la ruta de MPAK (ver, por ejemplo, Davies et al., Nature 417:949-954, (2002)). Estos resultados sugieren que las mutaciones, en particular en las rutas de transducción de señales, pueden ser características de tipos particulares de tumor y que dichas rutas específicas alteradas de transducción de señales podrían ser una diana prometedora para la intervención quimioterapéutica.

60 Las patentes WO 2006/119980, WO 2006/105642 y BARTLING B. ET AL.: "Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma", LUNG CANCER, vol.49, no. 2, Agosto 2005, p.145-154. describe métodos relacionados con la selección de un fármaco apropiado para el cáncer de pulmón

y la correspondiente prognosis WO 02/090964, WO 2006/055739 y ANGENENDT P ET AL: "3D Protein Microarrays: performing multiplex immunoassays on a single chip", ANALYTICAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, US, vol. 75, no. 17, Septiembre 2003, p.4368-4372 describe el uso de una pluralidad de diluciones seriadas de anticuerpos de captura.

5 J. A. Engelman ET AL: "ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines" Procedente de la Academia Nacional de Ciencias, vol.102, no.10, Marzo 2005, p.3788-3793 trata sobre la expresión de ErbB3 en líneas celulares NSCLC sensibles a gefinitib.

10 Dado que diferentes tratamientos del cáncer, particularmente la quimioterapia del cáncer, pueden funcionar directa o indirectamente mediante el bloqueo o la activación de las rutas celulares de transducción de señales implicadas en la proliferación o muerte celular, respectivamente, la actividad de una ruta dada de transducción de señales en una forma particular de cáncer podría servir como un buen indicador de la eficacia de diversos tratamientos del cáncer. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, además de satisfacer otras necesidades, la presente invención proporciona un método para evaluar la efectividad de las potenciales terapias anticáncer en un paciente individual. De esta manera, la presente invención proporciona métodos para ayudar al médico a seleccionar una terapia del cáncer adecuada, a la dosis correcta y en el momento correcto para cada paciente.

20 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona métodos para detectar los estados de activación de los componentes de las rutas de transducción de señales en las células tumorales de pulmón (por ejemplo células circulantes de un tumor de pulmón). La información sobre los estados de activación de los componentes de las rutas de transducción de señales derivadas de la práctica de la presente invención puede utilizarse para el diagnóstico del cáncer, para el pronóstico y para el diseño de tratamientos del cáncer. La invención está definida por las reivindicaciones.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 muestra un ejemplo de una ruta de transducción de señales implicada en la proliferación celular que puede utilizarse en la práctica de la invención. Se ilustran componentes de la ruta EGFR/MAPK/ERK que es utilizada por las células para convertir una señal mitogénica en proliferación celular.

Figura 2 muestra esquemáticamente la aplicación de las matrices direccionables de la invención para la selección de fármacos durante el curso del tratamiento del cáncer

35 Figura 3 muestra un ejemplo esquemático de una matriz direccionable que comprende diluciones de anticuerpos contra componentes de una ruta de receptor de tirosina quinasa, tales como aquellos en la ruta EGFR/MAPK/ERK.

Figura 4 muestra un ejemplo esquemático de una matriz direccionable que comprende diluciones de anticuerpos contra componentes de rutas de transducción de señales activadas en la angiogénesis tumoral.

Figura 5 A-B muestra una enumeración CTC usando el sistema Veridex CellSearch en un paciente 2002 (A) y un paciente 2015 (B).

45 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Introducción

Tal como se ha descrito anteriormente, la activación de las rutas de transducción de señales que participan en la proliferación celular y la desactivación de las rutas implicadas en la muerte celular son ejemplos no limitativos de características moleculares que caracterizan muchos tipos diferentes de cáncer. En muchos casos, la actividad de rutas particulares de transducción de señales y de los componentes de las mismas, pueden servir como firmas moleculares para un tipo de cáncer dado. Dichos componentes activados pueden proporcionar además dianas útiles para la intervención terapéutica. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, el conocimiento del nivel de actividad de un sistema particular de transducción de señales dentro de una célula de cáncer antes, durante y después del tratamiento proporciona al médico una información altamente relevante que puede utilizarse para seleccionar un curso de tratamiento apropiado. Además, el seguimiento continuo de las rutas de transducción de señales que se encuentran activas en las células de cáncer a medida que progresa el tratamiento puede proporcionar al médico información adicional sobre la eficacia del tratamiento, motivando al médico a que continúe con un curso de tratamiento particular o a que cambie a otra línea de tratamiento en el caso de que, por ejemplo, las células de cáncer hayan adquirido resistencia al tratamiento por aberraciones posteriores que activan la misma ruta u otras rutas de transducción de señales.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona métodos para la detección de la expresión y estados de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales desreguladas en tejido tumoral o en células extratumorales, tales como células circulantes raras de un tumor sólido en un ensayo multiplex de alto rendimiento específico. La invención proporciona además métodos para la selección de una terapia apropiada (fármacos individuales o combinaciones de fármacos) para regular negativamente o cerrar una ruta de señalización desregulada. De esta manera, la invención puede utilizarse para facilitar el diseño de terapias personalizadas para pacientes de cáncer.

La capacidad de detectar e identificar células tumorales en la circulación mediante la determinación de la actividad de rutas de transducción de señales al nivel de células individuales es una ventaja importante de la presente invención. Con frecuencia se encuentran células tumorales en la sangre de pacientes con diversos estadios tempranos de cáncer, en forma de "micrometástasis" (células tumorales diseminadas) y también se encuentran en cánceres metastásicas. El número de células tumorales en la sangre dependerá del estadio y tipo de tumor. Aunque las biopsias típicamente se obtienen de tumores primarios, la mayoría de los tumores metastásicos no se biopsian, dificultando mucho el análisis molecular de dichas muestras tumorales. Durante la metástasis tumoral, las células tumorales más agresivas abandonan el tumor primario y viajan por la sangre y el sistema linfático hasta alcanzar un sitio distante. De esta manera, las células tumorales circulantes en la sangre representan la población más agresiva y homogénea de células tumorales. Sin embargo, el número de células tumorales metastásicas en la sangre con frecuencia es muy bajo, variando entre uno y varios miles de células por mililitro de sangre. La capacidad de aislar y someter a ensayo las rutas de transducción de señales en dichas células raras y de aplicar dicha información a conseguir tratamientos más efectivos para el cáncer es un objetivo de la presente invención.

En algunas realizaciones, los inmunoensayos multiplex de alto rendimiento de la presente invención pueden detectar el estado de activación de una o más moléculas de transducción de señales en células circulantes de un tumor sólido al nivel de células individuales. De hecho, pueden detectarse moléculas de transducción de señales tales como EGFR con una sensibilidad de aproximadamente 100 zeptomoles y con un rango dinámico lineal de entre aproximadamente 100 zeptomoles y aproximadamente 100 femtomoles. De esta manera, la detección en células individuales del estado de activación de múltiples transductores de señales en células circulantes raras facilita el pronóstico y diagnóstico del cáncer, así como el diseño de terapias dirigidas personalizadas.

Entre las células circulantes raras se incluyen las células circulantes de un tumor sólido que han sido metastizadas o micrometastizadas a partir de un tumor sólido. Las células tumorales circulantes, las células madre cancerosas y las células que migran a un tumor (por ejemplo debido a la quimioatracción), tales como las células progenitoras endoteliales circulantes, las células endoteliales circulantes, las células mieloides proangiogénicas circulantes y las células dendríticas circulantes son algunos ejemplos de células circulantes asociadas a un tumor sólido.

Las moléculas de transducción de señales de interés típicamente se extraen poco después de aislar las células circulantes con el fin de conservar su estado de activación *in situ*, preferentemente dentro de las primeras aproximadamente 24, 6 ó 1 hora, y más preferentemente dentro de los primeros aproximadamente 30, 15 ó 5 minutos. Las células aisladas también pueden incubarse con uno o más factores de crecimiento, habitualmente a concentraciones entre nanomolares y micromolares, durante aproximadamente 1-30 minutos con el fin de resucitar o estimular la activación de las moléculas de transducción de señales (ver, por ejemplo, Irish et al., Cell 118:217-228 (2004)).

Tal como se explica en mayor detalle en la presente memoria, para evaluar las potenciales terapias anticáncer para un paciente individual, las células aisladas pueden incubarse con uno o más fármacos anticáncer a diferentes dosis. A continuación puede llevarse a cabo una estimulación con factor de crecimiento durante unos cuantos minutos (por ejemplo, entre aproximadamente 1-5 minutos) o durante varias horas (por ejemplo, durante aproximadamente 1-6 horas). La activación diferencial de las rutas de señalización con y sin fármacos anticáncer puede ayudar en la selección de una terapia de cáncer adecuada a la dosis apropiada para cada paciente individual. Las células circulantes también pueden aislarse a partir de una muestra de paciente durante el tratamiento con fármaco anticáncer y estimularse con uno o más factores de crecimiento para determinar si debería implementarse un cambio de terapia. De esta manera, los métodos de la presente invención ayudan ventajosamente al médico clínico a proporcionarles el fármaco anticáncer correcto a la dosis correcta en el momento correcto para cada paciente.

II. Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos y expresiones siguientes presentan los significados asignados a los mismos, a menos que se indique lo contrario.

El término "cáncer" pretende incluir cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizada por el crecimiento descontrolado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres y condiciones neoplásicas conocidos, caracterizados como malignos, benignos, tejido blandos o sólidos, y cánceres de todos los estadios y

grados, incluyendo cánceres premetastásicos y postmetastásicos. Entre los ejemplos de diferentes tipos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón (por ejemplo, el cáncer de pulmón de células no pequeñas); los cánceres digestivos y gastrointestinales tales como el cáncer colorrectal, los tumores estromales gastrointestinales, los tumores carcinoides gastrointestinales, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el

5
10
15

El término "analito" incluye cualquier molécula de interés, típicamente una macromolécula tal como un polipéptido, cuya presencia, cantidad y/o identidad se determina. En determinados casos el analito es un componente celular de células circulantes de un tumor sólido, preferentemente una molécula de transducción de señales.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "serie de dilución" pretende incluir una serie de concentraciones decrecientes de una muestra particular (por ejemplo, un lisado celular) o reactivo (por ejemplo, un anticuerpo). Típicamente se produce una serie de dilución mediante un procedimiento de mezcla de una cantidad medida de una concentración inicial de una muestra o reactivo con un diluyente (por ejemplo, una solución tampón de dilución) con el fin de crear una concentración más baja de muestra o reactivo, y la repetición del procedimiento suficientes veces para obtener el número deseado de diluciones en serie. La muestra o reactivo puede diluirse en serie por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 ó 1.000 veces para producir una

20
25
30

serie de dilución que comprende por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 concentraciones decrecientes de la muestra o reactivo. Por ejemplo, puede producirse una serie de dilución que comprenda una dilución en serie de 2 veces de un reactivo de anticuerpo de captura a una concentración inicial de 1 mg/ml mediante la mezcla de una cantidad de la concentración inicial de anticuerpo de captura con una cantidad igual de una solución tampón de dilución para crear una concentración de 0,5 mg/ml del anticuerpo de captura, y repetir el procedimiento para obtener concentraciones de anticuerpo de captura de 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml, y similares.

La expresión "rango dinámico superior" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la capacidad de un ensayo de detectar un analito específico en tan sólo una célula o en hasta miles de células. Por ejemplo, los inmunoensayos descritos en la presente memoria presentan un rango dinámico superior debido a que detectan ventajosamente una molécula particular de interés de transducción de señales en aproximadamente 1-10.000 células utilizando series de dilución de concentraciones de anticuerpo de captura.

35

La expresión "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que pueden llevar a cabo el proceso por el que una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una respuesta, incluyendo típicamente secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas en el interior de la célula. Entre los ejemplos de moléculas de transducción de señales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, receptores de tirosina quinasa tales como EGFR (por ejemplo, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor relacionado con receptor de insulina), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, LTK (tirosina quinasa de leucocitos), ALK (quinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, RTK 106; no receptores de tirosina quinasa tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK; componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa tales como Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNK, p38, Shc (p66), PI3K, Ras (por ejemplo, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p70 S6 quinasa, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 y paxilina; y las combinaciones de los mismos.

40
45
50

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "células circulantes" comprende células extratumorales que han metastazado o micrometastazado a partir de un tumor sólido. Entre los ejemplos de células circulantes se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, células tumorales circulantes, células madre cancerosas y/o células que migran al tumor (por ejemplo, células progenitoras endoteliales circulantes, células endoteliales circulantes, células mieloides proangiogénicas circulantes, células dendríticas circulantes, etc.).

55
60

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un paciente. Entre las muestras se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), saliva, orina, deposiciones (es

decir, heces), esputo, líquido de lavado bronquial, lágrimas, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa (por ejemplo, células tumorales diseminadas del ganglio linfático), líquido aspirado con aguja fina y cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (por ejemplo, tejido tumoral), tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo, biopsia con aguja) y extractos celulares de los mismos. En algunas realizaciones la muestra es de sangre completa o un componente fracción de la misma, tal como plasma, suero o un pellet celular. En realizaciones preferentes la muestra se obtiene mediante aislamiento de células circulantes de un tumor sólido procedente de sangre completa o de una fracción celular de la misma utilizando cualquier procedimiento conocido de la técnica. En otras realizaciones la muestra es una muestra de tejido tumoral fijada en formalina y embebida en parafina (FFPE), por ejemplo, de un tumor sólido de pulmón, colon o recto.

Una "biopsia" se refiere al procedimiento de extirpación de una muestra de tejido para la evaluación diagnóstica o pronóstica y al espécimen de tejido mismo. Puede aplicarse cualquier técnica de biopsia conocida en el estado del arte. La técnica de biopsia aplicada generalmente dependerá del tipo de tejido que debe evaluarse y del tamaño y tipo de tumor (es decir, sólido o suspendido (es decir, sangre o ascites)), entre otros factores. Entre las técnicas de biopsia representativas se incluyen la biopsia por excisión, la biopsia por incisión, la biopsia con aguja (por ejemplo la biopsia con aguja gruesa, la biopsia por aspiración con aguja fina, etc.), la biopsia quirúrgica y la biopsia de médula ósea. Se comentan las técnicas de biopsia en, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper et al., editores, 16a edición, 2005, capítulo 70 y en toda la parte V.

El término "sujeto" o "paciente" o "individuo" típicamente incluye seres humanos, aunque también puede incluir otros animales tales como, por ejemplo, otros primates, roedores, perros, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

Una "matriz" o "micromatriz" comprende un conjunto y/o serie de dilución diferenciado de anticuerpos de captura inmovilizados o fijados sobre un soporte sólido tales como, por ejemplo, vidrio (por ejemplo un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nilón, nitrocelulosa, cloruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. Los anticuerpos de captura generalmente se inmovilizan o fijan sobre el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). Las matrices utilizadas en los ensayos de la presente invención típicamente comprenden una pluralidad de diferentes anticuerpos de captura y/o concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan con la superficie de un soporte sólido en diferentes sitios conocidos/direccionables.

La expresión "anticuerpo de captura" pretende incluir un anticuerpo inmovilizado que es específico de (es decir se une, es ligado por o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra. En realizaciones preferentes, el anticuerpo de captura se fija sobre un soporte sólido en una matriz. Los anticuerpos de captura adecuados para inmovilizar cualquiera de entre una diversidad de moléculas de transducción de señales sobre un soporte sólido se encuentran disponibles de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA).

La expresión "anticuerpo de detección" tal como se utiliza en la presente memoria incluye un anticuerpo que comprende un marcaje detectable que es específico para (es decir, se une a, es ligado por o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra. La expresión comprende además un anticuerpo que es específico para uno o más analitos de interés, en el que el anticuerpo puede ser ligado por otra especie que comprende un marcaje detectable. Entre los ejemplos de marcajes detectables se incluyen, aunque sin limitación, marcajes de biotina/estreptavidina, marcajes de ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos), marcajes químicamente reactivos, marcajes fluorescentes, marcajes enzimáticos, marcajes radioactivos y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos de detección adecuados para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquiera de entre una diversidad de moléculas de transducción de señales se encuentran disponibles de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA). A título de ejemplo no limitativo, los anticuerpos fosfoespecíficos contra diversas formas fosforiladas de moléculas de transducción de señales tales como EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK/ERK, PTEN, Raf y MEK se encuentran disponibles de Santa Cruz Biotechnology.

La expresión "anticuerpo dependiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico de (es decir, se une a, es ligado por o forma un complejo con) un estado de activación particular de uno o más analitos de interés en una muestra. En realizaciones preferentes, el anticuerpo dependiente del estado de activación detecta la fosforilación, ubiquitinación y/o estado de acomplejamiento de uno o más analitos, tales como una o más moléculas de transducción de señales. En algunas realizaciones, la fosforilación de miembros de la familia de EGFR de receptores de tirosina quinasa y/o la formación de complejos heterodiméricos entre miembros de la familia de EGFR se detecta utilizando anticuerpos dependientes del estado de activación. Entre los ejemplos no limitativos de estados de activación (listados entre paréntesis) que resultan adecuados para la detección de anticuerpos

dependientes del estado de activación se incluyen: EGFR (EGFRvIII, EGFR fosforilado (p-), EGFR:Shc, EGFR ubiquitinado (u-), p-EGFRvIII); ErbB2 (p85: truncado (Tr) -ErbB2, p-ErbB2, p85:Tr-p-ErbB2, HER-2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); IGF1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT);

5 FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRa (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLCg, VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCy, VEGFR2:Src, VEGFR2: sulfato de heparina, VEGFR2: VE-cadherina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tie1 (p-Tie1); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFKB y/o IKB (p-IK (S32), p-NFKB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad:14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (pJnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); y paxilina (p-paxilina (Y118)).

15 La expresión "anticuerpo independiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico de (es decir, se une a, es ligado por o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra con independencia de su estado de activación. Por ejemplo, el anticuerpo independiente del estado de activación puede detectar formas tanto fosforiladas como no fosforiladas de uno o más analitos, tales como una o más moléculas de transducción de señales.

20 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena sencilla o doble cadena, tales como, por ejemplo, ADN y ARN. Entre los ácidos nucleicos se incluyen los ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótido, o residuos o enlaces esqueléticos modificados, los cuales son sintéticos, naturales y no naturales, y que presentan propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Entre los ejemplos de dichos análogos se incluyen, aunque sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-metilribonucleótidos y ácidos péptido-nucleicos (APN). A menos que se encuentre específicamente limitado, la expresión comprende ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que presentan propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácidos

25 nucleicos también comprende implícitamente las variantes modificadas conservadoramente de la misma y secuencias complementarias, así como las secuencias indicadas explícitamente.

30 El término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de cadena sencilla de ARN, ADN, híbrido de ARN/ADN y/o un mimético de los mismos. En determinados casos, los oligonucleótidos están compuestos de nucleobases, azúcares y enlaces internucleósido (esqueléticos) naturales (es decir, no modificados). En otros casos, los oligonucleótidos comprenden nucleósidos, azúcares y/o enlaces internucleósido modificados.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "motivo de desapareamiento" o "región de desapareamiento" se refiere a una parte de un oligonucleótido que no presenta una complementariedad del 100% con su secuencia complementaria. Un oligonucleótido puede presentar por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones de desapareamiento. Las regiones de desapareamiento pueden ser contiguas o pueden estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ó más nucleótidos. Los motivos o regiones de desapareamiento pueden comprender un único nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o más nucleótidos.

40 La expresión "condiciones de hibridación restrictiva" se refiere a condiciones bajo las que un oligonucleótido se hibridará con su secuencia complementaria, pero no con otras secuencias. Las condiciones restrictivas son dependientes de la secuencia y serán diferentes bajo diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, "Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes",

45 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays", (1993). Generalmente las condiciones restrictivas se seleccionan entre aproximadamente 5-10 °C inferiores al punto de fusión térmica (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La Tm es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibrida con la secuencia diana en el equilibrio (ya que las secuencias diana se encuentran presentes en exceso, a la Tm, el

50 50% de las sondas se encuentra ocupado en el equilibrio). También pueden conseguirse condiciones restrictivas con la adición de agentes desestabilizadores, tales como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es de por lo menos dos veces el nivel de fondo, preferentemente de 10 veces el nivel de hibridación de fondo.

60 La expresión "sustancialmente idéntico" o "identidad sustancial" en el contexto de dos o más ácidos nucleicos se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que presentan un porcentaje definido de nucleótidos que son iguales (es decir, con una identidad de por lo menos aproximadamente 60%, preferentemente de por lo menos aproximadamente 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% en una región definida) en la

comparación y alineación para la correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada según se mide con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Dicha definición, en el caso de que lo indique el contexto, se refiere análogamente además al complemento de la secuencia. Preferentemente la identidad sustancial existen en una región que presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 ó 100 nucleótidos

III. Descripción de las realizaciones

En una de las realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la detección de la expresión y estados de activación de una pluralidad de transductores de señales desregulados en células tumorales derivadas de tejido tumoral o células circulantes de un tumor sólido en un ensayo multiplex de alto rendimiento específico. La invención proporciona además métodos para la selección de terapias apropiadas para regular negativamente o silenciar una o más de las rutas de señalización desreguladas. De esta manera, pueden utilizarse realizaciones de la invención para facilitar el diseño de terapias personalizadas basadas en la firma molecular particular proporcionada por la colección de proteínas activadas de transducción de señales en un tumor de un paciente dado.

Entre las células circulantes de un tumor sólido se incluyen las células que han metastazado o micrometastazado a partir de un tumor sólido, incluyendo células madre cancerosas o células que migran al tumor (por ejemplo, debido a quimioatracción), tales como las células progenitoras endoteliales, las células endoteliales circulantes, los pericitos, las células mieloides proangiogénicas circulantes, las células dendríticas, etc. Pueden obtenerse muestras de un paciente que contienen las células circulantes a partir de cualquier líquido accesible (por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, esputo, líquido de lavado bronquial, orina, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva, líquido aspirado con aguja fina, etc.). En determinados casos, la muestra de sangre completa se separa en una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, el pellet celular). La fracción celular típicamente contiene células de glóbulos rojos, células de glóbulos blancos y/o células circulantes de un tumor sólido tales como células tumorales circulantes (CTCs), células endoteliales circulantes (CECs), células progenitoras endoteliales circulantes (CEPCs), células madre cancerosas (CSCs), células tumorales diseminadas del ganglio linfático y combinaciones de las mismas. La fracción plasma o suero habitualmente contiene, entre otros, ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN) y proteínas que son liberadas por las células circulantes de un tumor sólido.

Las células circulantes típicamente se aíslan a partir de una muestra de un paciente utilizando uno o más métodos de separación, incluyendo, por ejemplo, la separación inmunomagnética (ver, por ejemplo, Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer 92:577-582 (2001)), el sistema CellTracks[®] de Immunicon (Huntingdon Valley, PA), la separación de microfluidos (ver, por ejemplo, Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci. 3:251-256, 2004; Lin et al., n° de resumen 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C., (2006)), FACS (ver, por ejemplo, Mancuso et al., Blood 97:3658-3661 (2001)), la centrifugación en gradiente de densidad (ver, por ejemplo, Baker et al., Clin. Cancer-Res. 13:4865-4871 (2003)) y los métodos de agotamiento (ver, por ejemplo, Meye et al., Int. J. Oncol. 21:521-530 (2002)).

En una de las realizaciones con el fin de conservar los estados de activación *in situ*, los transductores de señales se extraen ventajosamente poco después de aislar las células, preferentemente dentro de las 96, 72, 48, 24, 6 ó 1 hora siguientes, más preferentemente dentro de los 30, 15 ó 5 minutos siguientes. Las células aisladas también pueden incubarse ventajosamente con factores de crecimiento, habitualmente a concentraciones entre nanomolares y micromolares, durante aproximadamente 1-30 minutos con el fin de resucitar o estimular la activación de los transductores de señales (ver, por ejemplo, Irish et al., Cell 118:217-228 (2004)). Entre los factores de crecimiento estimuladores se incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la heregulina (HRG), TGF- α , PIGF, angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PEDGF, IGF, FGF, HGF, citoquinas y similares. Con el fin de evaluar las terapias anticáncer potenciales para un paciente individual, previamente a la estimulación con factor de crecimiento, las células aisladas pueden incubarse con uno o más fármacos anticáncer de diferentes dosis. La estimulación con factor de crecimiento puede llevarse a cabo durante unos cuantos minutos u horas (por ejemplo 1-5 minutos hasta 1-6 horas). La activación diferencial de las rutas de señalización con y sin fármacos anticáncer ayuda en la selección de una terapia de cáncer adecuada a la dosis apropiada para cada paciente individual. Tras el aislamiento, tratamiento con agente anticáncer y/o estimulación con factor de crecimiento, las células se lisan para extraer los transductores de señales utilizando cualquier procedimiento conocido de la técnica. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente 1-5 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y (2) aproximadamente 30-180 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento. Alternativamente, el lisado puede almacenarse a -80°C hasta su utilización.

En algunas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente que interfiere con la función de componentes de la ruta activada de transducción de señales en las células cancerosas. Entre los ejemplos no limitativos de dichos agentes se incluyen los listados a continuación:

Tabla A

EGFR (ErbB1) (A)	Her 2 (ErbB2) (C)	Her 3 (ErbB3) (E)	Diana Her4 (ErbB4)
Cetuximab	Trastuzumab	Anticuerpo (U3)	
Panitumumab	(Herceptin)		
Matuzumab	Pertuzumab (ADN)		
Nimotuzumab	BMS-599626 (Heterodimerización Her1/2; Fase 1)		
Vacuna de EGFR			

EGFR (ErbB1) (B)	Her 2 (ErbB2) (D)
Erlotinib	CP-724714 (Pfizer)
Gefitinib	
CP-724714 (Pfizer)	
CL-387-785 (Wyeth, Irreversible, Preclínico)	

ErbB1/2 (F)
 Lapatinib
 HKI-272 (Wyeth, Irreversible, I/II NSCLC, Mama)
 HKI-357 (Preclínico)
 BIBW 2992 (Boehringer Ingelheim, Irreversible, I/II Próstata, Ovario, Mama)

ErbB1/2/4 (G)
 Canertinib (Pfizer, Irreversible, II NSCLC, Mama)
 ARRY-334543
 JNJ-26483327
 JNJ-26483327

Raf (H)	SRC
Sorafenib	AZ
PLX4032 (Plexxikon)	

Mek: (I)	NFkB-IkB
PD-325901 (II: NSCLC)	
AZD6244–Array/Az	
XL518 Exelisis/ADN	

Diana mTor (J)
 Rad 001: Everolimus (Novartis, combinación con Gefetinib/Erlotinib; I/II: NSCLC, Glioblastoma)
 Temsirolimus (Wyeth, combinación con Gefetinib/Erlotinib; I/II: NSCLC, Glioblastoma)
 AP-23573 (Ariad, I/II: Endometrial)

PI3K:
 PX-866 (Inhibición específica P110alpha; ProIX Pharma; NSCLC Preclínico)

Diana VEGF (Dianas VEGFR2 y VEGFR1) (K)
 Avastin (ADN)
 HuMV833 (PDL) anti-VEGFa
 VEGF-Trap-Regeneron/Aventis (mimetiza al receptor) (Fase 2)

(continuación)

Diana (L) VEGFR-2

EPH A-D

DC101-Imclone (Fase 2/3?)

IMC-IC11 IgG1 quimérico contra VEGFR2

IMC1121 B totalmente humanizado

CDP-791 (Celltech, anticuerpo di-Fab pegilado contra R2

Pazopanib (GSK) (Mieloma múltiple, ovárico, Inducción completa de la Fase 3 RCC, sarcoma II)

CDP-791 (UCB)

CP-547632 (OSI, PFIZER): (+ EGFR + PDGFR) (NSCLC, Ovárico Fase 2)

AG13736 (Pfizer): VEGFR1,2 y PDGFRbeta) (RCC II)

E-7080 (Eisai)

CHIR-258 (VEGFR1, 2 FGFR3, PDGFR)

OSI-930 (+ cKit, PDGFR)

Bay-579352 (+ PDGFR)

ABT-869 (+ CSF1 R, Erk, Flt-3, PDGFR)

BMS-540215 (+ FGFR1)

KRN-951

BBIW

VEGFR 1/2/3:

AZD 2171 (NSCLC, CRC)

AMG-706 (+ PDGFR)

VEGFR 2/ErbB1/2 (EGFR)/cMet/FGFR (M)

ZD6474 (vandetanib) (Fase III: tiroides, NSCLC)

XL647 (Exelixis; también EPHB2): (Paciente resistente al Erlotinib; Pacientes asiáticos) (Fase 2)

AEE 788 (Novartis, Fase 1/2)

VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/Flt-3 (N) TIE 1/2

Sorafenib (RCC, HCC, NSCLC (III), Melanoma (III)),

VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit/ (O)

Diana PDGFR (P)

PTK787 (Not cFMS, FLT-3)

Tandutinib

Sunitinib

Nilotinib

XL-999

SU-6668 (Pfizer)

GSK

AZ (AZD2171)

AZ (AZD2171)

Novartis (AEE-788)

Amgen

Otros

Diana Abl: (Q)

FTL 3

RET

Imatinib

Dasatinib

(continuación)

Diana Abl: (Q) **FTL 3** **RET**

Nilotinib
AT-9283
AZD-0530
Bosutinib

Diana Kit (R) **HGFR1/2** **HGFR1/2**

AMG-706 Chiron
XL-880
XL-999

Diana IGF-1R (S)

Merck
Pfizer
Novartis

Inhibidores de HSP90:

IPI-504 (Infinity Pharma, EGFR mutante, mieloma múltiple I/II, GIST) 17-AAG (Kosan, tumores sólidos I/II)

Fármacos Antimitóticos:

Docetaxel (estabilizador de microtúbulos; Adyuvante y cáncer mamario avanzado; NSCLC, cáncer prostático independiente de andrógenos)
Paclitaxel (estabilizador de microtúbulos; adyuvante y cáncer mamario avanzado; NSCLC, cáncer ovárico, Sarcoma de Kaposi asociado a SIDA)
Vinblastina, Vincristina, vinorelbina (Desestabilizador de microtúbulos)

Otras dianas:

Inhibidores HDAC
BCL2
Quimioterapéuticos (degradación)
inhibidores del proteosoma

5 La presente invención utiliza una matriz direccionable que presenta un rango dinámico superior que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido, en la que los anticuerpos de captura en cada serie de dilución son específicos para uno o más analitos correspondientes a un componente de una ruta de transducción de señales. En diversos aspectos, lo anterior incluye matrices que comprenden componentes de rutas de transducción de señales característicos de tumores particulares, por ejemplo rutas de transducción de señales activas en las células de cáncer de pulmón. De esta manera, la invención puede ponerse en práctica ventajosamente, en la que cada tipo de cáncer está representado en una matriz o chip individual. En algunos aspectos, los componentes de una ruta dada de transducción de señales activa en una célula tumoral particular se organizan ordenadamente en una secuencia lineal que corresponde a la secuencia en la que se envía la información a través de una ruta de transducción de señales dentro de una célula. Se muestran ejemplos de dichas matrices en las Figuras 3 y 4.

15 Entre los ejemplos no limitativos de rutas de transducción de señales que pueden ser cuestionados utilizando la presente invención se incluyen los mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1

Ruta 1	EGFR	Fosfo EGFR	EGFR She	EGFR Ubiquitina	EGFR-P13K	PTEN		
Ruta 2	EGFR	EGFRVIII	Fosfo EGFR	EGFR She	EGFR Ubiquitina	EGFRVIII Fosfo	PTEN	
Ruta 3	ERBB2	Fosfo ERBB2	Her 2 Shc	Complejo ERBB2:P13K	ERBB2 Ubiquitina	PTEN		
Ruta 4	ERBB2	P85Truncado ERBB2	Fosfo ERBB2	P85Truncado Fosfo ERBB2	Her 2 She	Complejo ERBB:P13K	ERBB2 Ubiquitina	
Ruta 5	ERBB3	Fosfo ERBB3	ERBB3:P13K Complex	ERBB3 Fosfo P13K	ERBB3:Shc			
Ruta 6	ERBB4	Fosfo ERBB4	ERBB4:Shc					
Ruta 7	IGF-1R	Fosfo IGF-1R	IGF-IR:IRS	IRS:P13K	Fosfo IRS	IGF-IR P13K		
Ruta 8	INSR	Fosfo INSR						
Ruta 9	KIT	Fosfo KIT						
Ruta 10	FLT3	Fosfo FLT3						
Ruta 11	HGFR 1	Fosfo HGFR 1						
Ruta 12	HGFR 2	Fosfo HGFR 2						
Ruta 13	RET	Fosfo RET						

(continuación)

Ruta 14	PDGFR alpha	Fosfo PDGFR alpha																	
Ruta 15	PDGFR beta	Fosfo PDGFR beta																	
Ruta 16	VEGFR 1	Fosfo VEGFR 1	Complejo VEGFR 1: PLCy	VEGFR 1: Src															
Ruta 17	VEGFR 2	Fosfo VEGFR 2	Complejo VEGFR 2: PLCy	VEGFR 2: Src	Complejo sulfato VEGFR-2/heparina	Complejo VEGFR-2, VE-cadherin													
Ruta 18	VEGFR 3	Fosfo VEGFR 3																	
Ruta 19	FGFR 1	Fosfo FGFR 1																	
Ruta 20	FGFR 2	Fosfo FGFR 2																	
Ruta 21	FGFR 3	Fosfo FGFR 3																	
Ruta 22	FGFR 4	Fosfo FGFR 4																	
Ruta 23	TIE 1	Fosfo TIE 1																	
Ruta 24	TIE 2	Fosfo TIE 2																	
Ruta 25	EPHA	Fosfo EPHA																	
Ruta 26	EPHB	Fosfo EPHB																	

(continuación)

Ruta 27	Complejo NFkB-IkB	Fosfo-IkB (S32) Total	Total NFkB (S536)	Fosfo P65 IkBa	Otros complejos ER				
Ruta 28	ER	Fosfo-ER	ER-AIB1						
Ruta 29	PR	Fosfo-Pr		Complejos PR					
Ruta 30	Ruta Hedgehog								
Ruta 31	Ruta Wnt								
Ruta 32	Ruta Notch								
Ruta 33	Mek Fosfo (S217/S221)	Total Erk Fosfo-Erk (T202/Y204)	Total Rsk-1 Fosfo-Rsk-1 (T357/S363)	Stat3 Total Fosfo-Stat-3 (Y705) (S727) Stat 1 Total Fosfo-Stat1 (Y701)	Fosfo-Bad (S112) (total)	Fak Total Fosfo-Fak Src (Y576)	Total Fosfo-cSrc (Y416)	Total Fosfo-Ras	Total Fosfo-Ras
Ruta 34	Akt Fosfo (T473)	Fosfo-Akt (T308)	Fosfo-Bad (S112) Bad (total)	Fosfo Bad (S136)	Complejo Bad:14-3-3	Total mTor Fosfo-mTor (S2448)	p70S6K Fosfo (T229) (T389)	Total GSK3beta Total Fosfo Ser 9)	
Ruta 35	Jnk Fosfo (T183/Y185)	Total p38 Fosfo-Jnk p38 (T180/Y182)	Total Rb Fosfo-Rb (S249/T2S2) Fosfo-Rb (S780)	Total p53 fosfo p53 Fosfo (S392) Fosfo p53 Fosfo (S20)	Fosfo-CREB (S133) Total	c-Jun Total Fosfo-c-Jun: (S63)	Paxilina Fosfo-paxilina (Y118)	Total Paxilina Fosfo-paxilina (Y118)	
Ruta 36	Ki67	Caspasa hendida 3,8,9, otras							
Ruta 37	TGF beta								

En determinadas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente antiseñalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa, un agente antiproliferativo, un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico), un agente radioterapéutico, una vacuna y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular el crecimiento incontrolado de células aberrantes tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, las células circulantes aisladas se tratan con uno o más agentes antiseñalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con por lo menos un agente quimioterapéutico.

Entre los ejemplos de agentes antiseñalización adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin[®]), alemtuzumab (Campath[®]), bevacizumab (Avastin[®]), cetuximab (Erbix[®]), gemtuzumab (Mylotarg[®]), panitumumab (Vectibix[™]), rituximab (Rituxan[®]) y tositumomab (BEXXAR[®]); inhibidores de tirosina quinasa tales como gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW-572016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar[®]), mesilato de imatinibe (Gleevec[®]), leflunómido (SU101) y vandetanib (ZACTIMA[™]; ZD6474); y combinaciones de los mismos.

Entre los agentes antiproliferativos ejemplares se incluyen inhibidores de mTOR tales como sirolimus (rapamicina), temsirolimus (CCI779) y everolimus (RAD001); inhibidores de Akt tales como 1L6-hidroxiometil-qui-ro-inositol-2-(R)-2O-metil-3-O-octadecil-sn-glicerocarboxilato, acetato de 9-metoxi-2-metil-elipticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1himidazo[4,5-g]quinoxalín-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosamicarbazona (complejo de Cu (II) Cl₂), API-2, un péptido 15-mero derivado de los aminoácidos 10 a 24 del protooncogén TCL1 (Hirumura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1, y los compuestos indicados en Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc. 125:1144-1145 (2003) y Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003); y las combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos se incluyen los fármacos basados en platino (por ejemplo oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iproplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (por ejemplo ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (por ejemplo 5-fluorouracilo, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, flouxuridina, fludarabina, gemcitabina (Gemzar[®]), pemetrexed (ALIMTA[®]), raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (Taxol[®]), docetaxel (Taxotere[®]), etc.), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos no limitativos de vacunas para el cáncer útiles en la presente invención se incluyen ANYARA de Active Biotech, DCVax-LB de Northwest Biotherapeutics, EP-2101 de IDM Pharma, GV1001 de Pharmexa, IO-2055 de Idera Pharmaceuticals, INGN 225 de Introgen Therapeutics y Stimuvax de Biomira/Merck.

Entre los ejemplos de agentes radioterapéuticos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, radionucleidos tales como ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At y ²¹²Bi, opcionalmente conjugados con anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.

En algunas realizaciones, cada dilución seriada de anticuerpos de captura comprende una serie decreciente de concentraciones de anticuerpo de captura. En determinados casos, los anticuerpos de captura se diluyen en serie por lo menos 2 veces (por ejemplo, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 ó 1.000 veces) con el fin de producir una serie de dilución que comprende un número prefijado (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 ó más) de concentraciones decrecientes de anticuerpo de captura que se aplican como puntos sobre la matriz. Preferentemente se aplicaron como puntos sobre la matriz por lo menos 2, 3, 4, 5 ó 6 réplicas de cada dilución de anticuerpo de captura.

En otras realizaciones, el soporte sólido comprende vidrio (por ejemplo un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nilón, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En una realización preferente, los anticuerpos de captura se fijan (por ejemplo, mediante interacciones covalentes o no covalentes) sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, tal como, por ejemplo, FAST[®]Slides, las cuales se encuentran disponibles comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

En algunas realizaciones, el extracto celular comprende un extracto de células circulantes de un tumor sólido. Las células circulantes típicamente se aíslan de una muestra de un paciente utilizando uno o más métodos de separación conocidos de la técnica, incluyendo, por ejemplo, la separación inmunomagnética, el sistema

CellTracks[®], la separación de microfluidos, FACS, la centrifugación en gradiente de densidad y los métodos de depleción.

5 En otras realizaciones, la muestra de un paciente comprende una muestra de líquido corporal, tal como, por ejemplo, una muestra de sangre completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, aspirado de médula ósea, orina, saliva y/o líquido aspirado con aguja fina. En determinados casos, la muestra de sangre completa se separa en una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, el pellet celular). La fracción celular típicamente contiene glóbulos rojos, glóbulos blancos y/o células circulantes de un tumor sólido, tales como CTC, CEC, CEPC, células tumorales diseminadas de ganglio linfático, y/o CSC. La fracción plasma o suero
10 habitualmente contiene, entre otros, ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN) y proteínas que son liberadas por las células circulantes de un tumor sólido.

15 En algunos casos, las células circulantes aisladas pueden estimularse *in vitro* con uno o más factores de crecimiento antes, durante y/o después de la incubación con uno o más fármacos anticáncer de interés. Anteriormente se han indicado factores de crecimiento estimuladores. En otros casos, las células circulantes aisladas pueden lisarse, por ejemplo tras la estimulación con factor de crecimiento y/o tratamiento con fármaco anticáncer, con el fin de producir el extracto celular (por ejemplo, un lisado celular) utilizando cualquier procedimiento conocido de la técnica. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente 1-5
20 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y (2) aproximadamente 30-180 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento. Alternativamente, el lisado celular puede almacenarse a -80°C hasta su utilización.

25 En realizaciones preferentes, la expresión y/o los estados de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales en células tumorales tales como células circulantes del tumor sólido, se detectan utilizando un ensayo de detección única o un ensayo de doble detección de proximidad tal como se indica posteriormente.

IV. Construcción de matrices de anticuerpos

30 En determinados aspectos, el estado de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales en un extracto celular de células tumorales tales como células circulantes procedentes de un tumor sólido, se detecta utilizando una matriz con anticuerpos que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido. Las matrices típicamente comprenden una pluralidad de diferentes anticuerpos de captura en un abanico de concentraciones de los anticuerpos de captura que se encuentran acoplados a la superficie del
35 soporte sólido en diferentes localizaciones direccionables.

40 El soporte sólido puede comprender cualquier sustrato adecuado para inmovilizar proteínas. Entre los ejemplos de soportes sólidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membranas, haces de fibras, geles, metal, cerámica y similares. Algunas membranas, tales como el nilón (Biotrans[™], ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe[®], Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), la nitrocelulosa (Protran[®], Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) y PVDF (Immobilon[™], Millipore Corp. (Billerica, MA)) resultan adecuadas para la utilización como soportes sólidos en las matrices utilizadas en la presente invención. Preferentemente, los anticuerpos de captura se fijan sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, por ejemplo, FAST[®] Slides, las cuales se encuentran disponibles
45 comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

50 Entre los aspectos particulares del soporte sólido que resultan adecuados se incluyen la capacidad de unirse a grandes cantidades de anticuerpos de captura y la capacidad de unirse a anticuerpos de captura con una desnaturalización mínima. Otro aspecto adecuado es que el soporte sólido muestra una "absorción" mínima al aplicar en el soporte las soluciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos de captura. Un soporte sólido con mínima absorción permite la aplicación en el soporte de alícuotas pequeñas de solución de anticuerpos de captura, resultando en puntos pequeños definidos de anticuerpo de captura inmovilizado.

55 Los anticuerpos de captura generalmente se inmovilizan sobre el soporte sólido directa o indirectamente (por ejemplo, mediante etiquetas de captura) mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En algunas realizaciones, los anticuerpos de captura se unen covalentemente al soporte sólido utilizando un entrecruzante homobifuncional o heterobifuncional utilizando métodos y condiciones de entrecruzamiento estándares. Los entrecruzantes adecuados se encuentran disponibles comercialmente de proveedores tales como,
60 por ejemplo, Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Entre los métodos para generar matrices adecuadas para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cualquier técnica utilizada para construir matrices de proteínas o ácidos nucleicos. En algunas

realizaciones, los anticuerpos de captura se aplican en forma de puntos sobre una matriz utilizando un robot micrométrico de depósito microspotter, que típicamente es un impresor robótico dotado de agujas ranuradas, agujas romas o un impresor de inyección. Entre los sistemas robóticos adecuados para la impresión de las matrices de anticuerpos descritas en la presente memoria se incluyen el robot PixSys 5000 (Cartesian Technologies, Irvine, CA) con agujas ranuradas ChipMaker2 (TeleChem International, Sunnyvale, CA), así como otros impresores robóticos disponibles de BioRobics (Woburn, MA) y de Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferentemente se aplicaron como puntos sobre la matriz por lo menos 2, 3, 4, 5 ó 6 réplicas de cada dilución de anticuerpo de captura.

Otro método para generar matrices adecuadas para la utilización en la presente invención comprende dispensar un volumen conocido de una dilución de anticuerpo de captura en cada posición seleccionada de la matriz mediante contacto de un dispensador capilar con un soporte sólido bajo condiciones efectivas para aplicar un volumen definido de líquido en el soporte, en el que dicho procedimiento se repite utilizando diluciones seleccionadas de anticuerpo de captura en cada posición seleccionada de la matriz con el fin de crear una matriz completa. El método puede ponerse en práctica formando una pluralidad de dichas matrices, en las que la etapa de deposición de solución se aplica en una posición seleccionada en cada uno de entre una pluralidad de soportes sólidos en cada ciclo repetido. Puede encontrarse una descripción adicional de dicho método en, por ejemplo, la patente U.S. N° 5,807,522.

En determinados casos, pueden utilizarse dispositivos de impresión en papel para generar las matrices de anticuerpos. Por ejemplo, la dilución deseada de anticuerpo de captura puede cargarse en el cabezal de impresión de una impresora de inyección e imprimirse sobre un soporte sólido adecuado (ver, por ejemplo, Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)).

En algunas realizaciones, la matriz generada sobre el soporte sólido presenta una densidad de por lo menos 5 puntos/cm² aproximadamente, y preferentemente al menos de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000 ó 9.000, ó 10, 000 puntos/cm².

En determinados casos, los puntos sobre el soporte sólido representan, cada uno, un anticuerpo de captura diferente. En determinados otros casos, múltiples puntos sobre el soporte sólido representan el mismo anticuerpo de captura, por ejemplo, como serie de dilución que comprende una serie de concentraciones decrecientes de anticuerpo de captura.

Se describen ejemplos adicionales de métodos para preparar y construir matrices de anticuerpos sobre soporte sólidos en las patentes U.S. Nos. 6,197,599, 6,777,239, 6,780,582, 6,897,073, 7,179,638 y 7,192,720; publicaciones de patente U.S. Nos. 20060115810, 20060263837, 20060292680 y 20070054326; y Varnum et al., Methods Mol. Biol. 264:161-172 (2004).

Se conocen en la técnica métodos para escanear matrices de anticuerpos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, cualquier técnica utilizada para escanear matrices de proteínas o ácidos nucleicos. Los escáners de micromatrices adecuados para la utilización en la presente invención se encuentran disponibles de PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) y Axon Instruments (Union City, CA). A título de ejemplo no limitativo, puede utilizarse un ScanArray3000 de GSI para la detección por fluorescencia con el software ImaGene para la cuantificación.

V. Ensayos de detección simple

En algunas realizaciones, el ensayo para detectar el estado de activación de un analito particular (por ejemplo, una molécula de transducción de señales) de interés en un extracto celular de células tumorales, tales como células circulantes procedentes de un tumor sólido, es un ensayo multiplex de dos anticuerpos de alto rendimiento que presenta un rango dinámico superior. Como un ejemplo no limitativo, los dos anticuerpos utilizados en el ensayo pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para el analito, (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, un anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz de detectar, por ejemplo, la fosforilación, la ubiquitinación y/o el estado de acomplejamiento del analito. Alternativamente el anticuerpo de detección comprende un anticuerpo independiente del estado de activación el cual detecta la cantidad total de analito en el extracto celular. El anticuerpo independiente del estado de activación es capaz generalmente de detectar las formas tanto activada como no activada del analito.

En una realización preferente, el ensayo de los dos anticuerpos comprende:

(i) Incubar el extracto celular con una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados,

5 (ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables.

(iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y segundo miembro de la pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y

10 (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

15 Los ensayos de dos anticuerpos descritos en la presente memoria típicamente son matrices de anticuerpos que comprenden una pluralidad de diferentes anticuerpos de captura en un abanico de concentraciones de los anticuerpos de captura que se encuentran acoplados a la superficie del soporte sólido en diferentes localizaciones direccionables. Se han descrito anteriormente ejemplos de soportes sólidos adecuados para la utilización en la presente invención.

20 Los anticuerpos de captura y de detección preferentemente se seleccionan para minimizar la competición entre ellos con respecto a la unión de analito (es decir, ambos, los anticuerpos de captura y de detección pueden unirse simultáneamente a sus moléculas de transducción de señales correspondientes).

25 En una realización de la presente invención, los anticuerpos de detección comprenden un primer miembro de un par de unión (por ejemplo, biotina) y el primer miembro del par de amplificación de señales comprende un segundo miembro del par de unión (por ejemplo, estreptavidina). Los miembros del par de unión pueden unirse directa o indirectamente a los anticuerpos de detección o al primer miembro del par de amplificación de señal empleando métodos bien conocidos en el estado de la técnica. En ciertos casos, el primer miembro del par de amplificación de señales es una peroxidasa (por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, eosinófilo peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa del tiroides, deyodinas, y similares), el segundo miembro del par de amplificación de señales es un reactivo de tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida). En esos casos, la señal de amplificación es generada por la oxidación de la peroxidasa del reactivo de tiramida para producir una tiramida activada en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

35 La tiramida activada puede detectarse directamente o detectarse bajo la adición de un reactivo de detección de señales tal como un fluoróforo de estreptavidina marcado o una combinación de una peroxidasa de estreptavidina marcada y un reactivo cromógeno. Ejemplos de fluoróforos disponibles para ser usados en la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un pigmento Alexa Fluor[®] (por ejemplo Alexa Fluor[®] 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green[™], rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), CyDye[™] flúor (por ejemplo Cy2, Cy3, Cy5), y similares. El marcaje estreptavidina puede acoplarse directa o indirectamente con el fluoróforo o peroxidasa utilizando métodos bien conocidos de la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos cromogénicos adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

45 En el Ejemplo 3 se proporciona un protocolo ejemplar para llevar a cabo los ensayos de dos anticuerpos descritos en la presente memoria.

50 La presente invención puede utilizar kits para llevar a cabo los ensayos de proximidad descritos anteriormente, que comprenden: (a) una serie de dilución de una pluralidad de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido, y (b) una pluralidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos, los kits puede contener además instrucciones de métodos de utilización del kit para la detección de los estados de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales de células circulantes procedentes de un tumor sólido. Los kit pueden contener además cualquiera de los reactivos adicionales indicados anteriormente con respecto a la realización de los métodos específicos de la presente invención tales como, por ejemplo, primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales, reactivos de amplificación de señales de tiramida, soluciones tampones de lavado, etc.

60 VI. Ensayos de detección de aproximación dual

En algunas realizaciones, el ensayo para detectar el estado de activación de un analito particular (por ejemplo, una molécula de transducción de señales) de interés en un extracto celular de células tumorales, tales como células circulantes procedentes de un tumor sólido, es un ensayo multiplex de proximidad de alto rendimiento (por ejemplo,

tres anticuerpos) que presenta un rango dinámico superior. Como un ejemplo no limitativo, los tres anticuerpos utilizados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para el analito, (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, un anticuerpo dependiente del estado de activación) y (3) un anticuerpo de detección el cual detecta la cantidad total del analito (por ejemplo, un anticuerpo independiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz de detectar, por ejemplo, la fosforilación, la ubiquitinación y/o el estado de acomplejamiento del analito. El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz generalmente de detectar las formas tanto activada como no activada del analito.

10 En una realización preferente, el ensayo de los dos anticuerpos comprende:

(i) Incubar el extracto celular con una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados,

15 (ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección comprendiendo una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación i una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables, donde los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con una fracción facilitadora, los anticuerpos dependientes del estado de activación se marcan con un primer miembro de una pareja de amplificación de señales y la fracción facilitadora genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro de la pareja de amplificación de señal.

20 (iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y segundo miembro de la pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y

25 (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

30 Alternativamente, se da a conocer que los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse con una fracción facilitadora y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un primer miembro de una pareja de amplificación de señales.

35 Los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria típicamente son matrices de anticuerpos que comprenden una pluralidad de diferentes anticuerpos de captura en un abanico de concentraciones de los anticuerpos de captura que se encuentran acoplados a la superficie del soporte sólido en diferentes localizaciones direccionables. Se han descrito anteriormente ejemplos de soportes sólidos adecuados para la utilización en la presente invención.

40 Los anticuerpos de captura y de detección preferentemente se seleccionan para minimizar la competición entre ellos con respecto a la unión de analito (es decir, ambos, los anticuerpos de captura y de detección pueden unirse simultáneamente a sus moléculas de transducción de señales correspondientes).

45 En algunas realizaciones, los anticuerpos independientes del estado de activación comprenden además una fracción detectable. En dichos casos, la cantidad de la fracción detectable guarda relación con la cantidad de uno o más de los analitos en el extracto celular. Entre los ejemplos de fracciones detectables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, marcajes fluorescentes, marcajes químicamente reactivos, marcajes enzimáticos, marcajes radioactivos y similares. Preferentemente, la fracción detectable es un fluoróforo, tal como un pigmento Alexa Fluor[®] (por ejemplo Alexa Fluor[®] 647), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green[™] 15, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraodamina (TRITC), CyDye[™] flúor (por ejemplo Cy2, Cy3, Cy5), y similares. La fracción detectable puede acoplarse directa o indirectamente a los anticuerpos independientes del estado de activación utilizando métodos bien conocidos de la técnica.

50 En determinados casos, los anticuerpos independientes del estado de activación se marcan directamente con la fracción facilitadora. La fracción facilitadora puede acoplarse con los anticuerpos independientes del estado de activación utilizando métodos bien conocidos de la técnica. Una fracción facilitadora apropiada para su uso en la presente invención comprende cualquier molécula capaz de generar un agente oxidante que es canalizado (es decir, es dirigido a) y que reacciona con (es decir, se une, es ligado o forma un complejo con) otra molécula en proximidad (es decir, espacialmente próxima o cercana) a la fracción facilitadora. Entre los ejemplos de fracciones facilitadoras incluyen sin limitación, enzimas tales como la glucosa oxidasa o cualquier otra enzima que catalice una reacción de oxidación/reducción que involucre el oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones, y fotosensibilizadores tales como el azul de metileno, rosa bengala, porfirinas, pigmentos de escuarato, ftalocianinas y similares. Entre los ejemplos no limitativos de agentes oxidantes se incluyen el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un oxígeno singlete y cualquier otro compuesto que transfiera átomos de oxígeno o gane electrones en una reacción de

oxidación/reducción. Preferentemente, en presencia de un sustrato adecuado (es decir, glucosa, luz, etc.), la fracción facilitadora (es decir, la glucosa oxidasa, fotosensibilizador, etc.) genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singlete, etc.) que se canaliza y reacciona con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales (por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante (HRP), hapteno protegido por un grupo protector, un enzima inactivado mediante enlace tioéter con un inhibidor de enzima, etc.) en el caso de que las dos fracciones se encuentren próximas entre sí.

En otros casos determinados, los anticuerpos independientes del estado de activación se marcan indirectamente con la fracción facilitadora mediante hibridación entre un conector oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un conector oligonucleótido complementario conjugado con la fracción facilitadora. Los conectores oligonucleótidos pueden acoplarse con la fracción facilitadora o con los anticuerpos independientes del estado de activación utilizando métodos bien conocidos de la técnica. En algunas realizaciones, el conector oligonucleótido conjugado con la fracción facilitadora presenta una complementariedad del 100% respecto al conector oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación. En otras realizaciones, la pareja de conectores oligonucleótidos comprende por lo menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones de desapareamiento, por ejemplo en la hibridación bajo condiciones de hibridación restrictivas. El experto en la materia apreciará que los anticuerpos independientes del estado de activación para diferentes analitos pueden conjugarse con el mismo conector oligonucleótido o con diferentes conectores oligonucleótidos.

La longitud de los conectores oligonucleótidos que se conjugan con la fracción facilitadora o con los anticuerpos independientes del estado de activación puede variar. En general, la secuencia del conector puede presentar una longitud de por lo menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 ó 100 nucleótidos. Típicamente se generan secuencias de ácidos nucleicos aleatorias para el acoplamiento. A título de ejemplo no limitativo, puede diseñarse una biblioteca de conectores oligonucleótidos para que presente tres dominios contiguos diferentes: un dominio espaciador, dominio de firma y dominio de conjugación. Preferentemente, los conectores oligonucleótidos se diseñan para un acoplamiento eficiente sin destruir la función de la fracción facilitadora o de los anticuerpos independientes del estado de activación con los que se encuentran conjugados.

Las secuencias conectoras oligonucleótidas pueden diseñarse para prevenir o minimizar cualquier formación de estructura secundaria bajo una diversidad de condiciones de ensayo. Típicamente se lleva a cabo un seguimiento cuidadoso de las temperaturas de fusión para cada segmento dentro del conector con el fin de permitir su participación en los procedimientos de ensayo globales. Generalmente, el intervalo de temperaturas de fusión del segmento de la secuencia conectora es de entre 1-10 °C. Los algoritmos informáticos (por ejemplo, OLIGO 6.0) para determinar la temperatura de fusión, la estructura secundaria y la estructura de horquilla bajo concentraciones iónicas definidas pueden utilizarse para analizar cada uno de los tres dominios diferentes dentro de cada conector. Las secuencias combinadas globales también pueden analizarse para caracterizar su estructura y compatibilidad con otras secuencias conectoras oligonucleótidas conjugadas, por ejemplo, para conocer si se hibridarán bajo condiciones de hibridación restrictivas con un conector oligonucleótido complementario.

La región espaciadora del conector oligonucleótido proporciona una separación adecuada del dominio de conjugación respecto al sitio de entrecruzamiento del oligonucleótido. El dominio de conjugación funciona uniendo las moléculas marcadas con una secuencia conectora oligonucleótida complementaria con el dominio de conjugación mediante hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación mediada por ácidos nucleicos puede llevarse a cabo antes o después de la formación del complejo de anticuerpo-analito (es decir, el antígeno), proporcionando un formato de ensayo más flexible. Al contrario que muchos métodos directos de conjugación de anticuerpos, la unión de oligonucleótidos relativamente pequeños a anticuerpos o a otras moléculas presenta un impacto mínimo sobre la afinidad específica de los anticuerpos para su analito diana o sobre la función de las moléculas conjugadas.

En algunas realizaciones, el dominio de secuencia de firma del conector oligonucleótido puede utilizarse en ensayos multiplexados complejos de proteínas. Pueden conjugarse múltiples anticuerpos con conectores oligonucleótidos que presentan diferentes secuencias de firma. En inmunoensayos multiplex, pueden utilizarse secuencias oligonucleótidas informadoras marcadas con sondas apropiadas para detectar la reactividad cruzada entre anticuerpos y sus antígenos en el formato de ensayo multiplex.

Los conectores oligonucleótidos pueden conjugarse con anticuerpos o con otras moléculas utilizando varios métodos diferentes. Por ejemplo, pueden sintetizarse conectores oligonucleótidos con un grupo tiol en el extremo 5' ó 3'. El grupo tiol puede desprotegerse utilizando agentes reductores (por ejemplo, TCEP-HCl) y los conectores resultantes pueden purificarse utilizando una columna de centrifugación para desalado. Los conectores oligonucleótidos desprotegidos resultantes pueden conjugarse con las aminas primarias de anticuerpos o de otros tipos de proteínas utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tales como SMCC. Alternativamente, pueden tratarse los grupos 5'-fosfato de los oligonucleótidos con carbodiimida de EDC soluble en agua con el fin de formar ésteres de fosfato y posteriormente acoplarse con moléculas que contienen amina. En determinados casos, el diol en el residuo de 3'-ribosa puede oxidarse formando grupos aldehído y después conjugarse con los grupos amina de anticuerpos o de

otros tipos de proteínas mediante aminación reductora. En determinados otros casos, el conector oligonucleótido puede sintetizarse con una modificación de biotina en el extremo 3' ó 5' y conjugarse con moléculas marcadas con estreptavidina.

5 Los conectores oligonucleótidos pueden sintetizarse utilizando cualquiera de entre una diversidad de procedimientos conocidos de la técnica, tales como los descritos en Usman et al., J. Am. Chem. Soc. 109:7845 (1987); Scaring et al., Nucl. Acids Res. 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res. 23:2677-2684 (1995), y Wincott et al., Methods Mol. Bio. 74:59 (1997). En general, la síntesis de oligonucleótidos utiliza grupos protectores y de acoplamiento habituales para los ácidos nucleicos, tales como el dimetoxitritilo en el extremo 5' y las fosforamiditas en el extremo 3'. Los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, los métodos para la desprotección de los ácidos nucleicos, y los métodos para la purificación de los ácidos nucleicos son conocidos por el experto en la materia.

15 En determinados casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación se marcan directamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales. El miembro de la pareja de amplificación de señales puede acoplarse con los anticuerpos dependientes del estado de activación utilizando métodos bien conocidos de la técnica. En determinados otros casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación se marcan indirectamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales mediante la unión entre un primer miembro de una pareja de unión conjugada con los anticuerpos dependientes del estado de activación y un segundo miembro de la pareja de unión conjugado con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales. Los miembros de la pareja de unión (por ejemplo, biotina/estreptavidina) pueden acoplarse con el miembro de la pareja de amplificación de señales o con los anticuerpos dependientes del estado de activación utilizando métodos bien conocidos de la técnica. Entre los ejemplos de miembros de la pareja de amplificación de señales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, peroxidasa tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, eosinófilo peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa del tiroides, deyodinasa, y similares. Entre otros ejemplos de miembros de pareja de amplificación de señales se incluyen haptenos protegidos por un grupo protector y enzimas inactivados mediante unión tioéter a un inhibidor enzimático.

30 En un ejemplo de canalización por proximidad, la fracción facilitadora es la glucosa oxidasa (GO) y el primer miembro de la pareja de amplificación de señales es la peroxidasa de rábano picante (HRP). Al poner en contacto la GO con un sustrato tal como glucosa, genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H₂O₂)). En el caso de que la HRP se encuentre dentro de una proximidad canalizadora a la GO, el H₂O₂ generado por la GO será canalizado y acoplado con la HRP, formando un complejo HRP-H₂O₂ que, en presencia del segundo miembro de la pareja de amplificación de señales (por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico tal como tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida), ácido homovanílico o ácido 4-hidroxifenilacético) generará una señal amplificada. Los métodos de utilización de GO y HRP en un ensayo de proximidad se describen en, por ejemplo, Langr y et al., U.S. Depart of Energy informe N° UCRL-ID-136797 (1999). En el caso de que se utilice biotina-tiramida como segundo miembro de la pareja de amplificación de señales, el complejo HRP-H₂O₂ oxida la tiramida, generando un radical tiramida reactivo que se une covalentemente a residuos nucleofílicos próximos. La tiramida activada se detecta directamente o después de la adición de un reactivo detector de señales tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Entre los fluoróforos adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un pigmento Alexa Fluor® (por ejemplo Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetrarodamina (TRITC), CyDye™ flúor (por ejemplo Cy2, Cy3, Cy5), y similares. El marcaje estreptavidina puede acoplarse directa o indirectamente con el fluoróforo o peroxidasa utilizando métodos bien conocidos de la técnica. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos cromogénicos adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolín6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

55 En otro ejemplo de canalización de proximidad, la fracción facilitadora es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de la señal es una molécula grande etiquetada con múltiples haptenos que están protegidos con grupos protectores que impiden la unión de los haptenos a una pareja de unión específica (por ejemplo, ligando, anticuerpo, etc.). Por ejemplo, el miembro del par de amplificación de la señal puede ser una molécula de dextrano marcado con biotina protegida, cumarina, y/o moléculas de fluoresceína. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, fenoxi-, analino-, olefin-, tioéter-, y grupos selenoéter- protectores. En la Patente de Estados Unidos N° 5,807,675 se describen, fotosensibilizadores adicionales y moléculas de hapteno protegidas adecuadas para uso en los ensayos de proximidad de la presente invención. Cuando el fotosensibilizador se excita con luz, genera un agente oxidante (por ejemplo, el oxígeno singlete). Si las moléculas de hapteno se encuentran dentro de la canalización de proximidad con el fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza y reacciona con tioéteres sobre los grupos protectores de los haptenos para producir grupos carbonilo (cetonas o aldehídos) y ácido sulfínico, liberando los grupos protectores de los haptenos. Los haptenos no protegidos están entonces disponibles para unirse específicamente al segundo miembro del par de

amplificación de la señal (por ejemplo, una pareja de unión específica que puede generar una señal detectable). Por ejemplo, cuando el hapteno es biotina, la pareja de unión específica puede ser una estreptavidina marcada con enzima. Las enzimas ejemplares incluyen fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, HRP, etc. Después del lavado para eliminar los reactivos no unidos, la señal detectable puede ser generada por la adición de un sustrato detectable de la enzima (por ejemplo, fluorescente, quimioluminiscente, cromogénico, etc.) y detectado usando métodos adecuados e instrumentación conocidos en la técnica. Alternativamente, la señal detectable puede ser amplificada usando la amplificación de señal de tiramida y la tiramida activada puede ser detectada directamente o detectada tras la adición de un reactivo de detección de señal tal como se describe anteriormente.

En otro ejemplo de canalización de proximidad, la fracción facilitadora es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de la señal es un complejo enzima-inhibidor. La enzima y el inhibidor (por ejemplo, dextrano marcado con ácido fosfónico) están unidos entre sí por un acoplador escindible (por ejemplo, tioéter). Cuando el fotosensibilizador se excita con luz, genera un agente oxidante (por ejemplo, el oxígeno singlete). Si el complejo enzima-inhibidor está dentro de la proximidad a la canalización del fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza y reacciona con el acoplador escindible, liberando el inhibidor de la enzima, y de esa manera activando la enzima. Se añade un sustrato de la enzima para generar una señal detectable, o alternativamente, se añade un reactivo de amplificación para generar una señal amplificada.

En un ejemplo adicional de canalización de proximidad, la fracción facilitadora es HRP, el primer miembro del par de amplificación de la señal es un hapteno protegido o un complejo enzima-inhibidor como se describe anteriormente, y los grupos protectores comprenden p-alcoxi fenol. La adición de fenilendiamina y H_2O_2 genera un reactivo de fenileno diimina el cual canaliza la protección de los haptenos o del complejo enzima-inhibidor y reacciona con los grupos protectores de fenol p-alcoxi para producir haptenos expuestos o una enzima reactiva. La señal amplificada se genera y se detecta como se describe anteriormente (véase, por ejemplo, las Patentes US Nos. 5,532,138 y 5,445,944).

En el Ejemplo 4 se proporciona un protocolo ejemplar para llevar a cabo los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria.

En otra realización, la presente invención puede utilizar kits para llevar a cabo los ensayos de proximidad descritos anteriormente, que comprenden: (a) una serie de dilución de una pluralidad de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido, y (b) una pluralidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones de métodos de utilización del kit para la detección de los estados de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales de células circulantes procedentes de un tumor sólido. Los kits pueden contener además cualquiera de los reactivos adicionales indicados anteriormente con respecto a la realización de los métodos específicos de la presente invención tales como, por ejemplo, primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales, reactivos de amplificación de señales de tiramida, sustratos para la fracción facilitadora, soluciones tampones de lavado, etc.

VII. Producción de anticuerpos

La generación y selección de anticuerpos no disponibles comercialmente todavía, para el análisis de los estados de activación de moléculas de transducción de señales en células tumorales tales como células circulantes raras según la presente invención puede llevarse a cabo de varias maneras. Por ejemplo, una manera es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, un antígeno) utilizando métodos de expresión y purificación de proteínas conocidos de la técnica, mientras que otra manera es sintetizar el polipéptido de interés utilizando métodos de síntesis peptídica en fase sólida conocidos de la técnica. Ver, por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, editor, Meth. Enzymol. Vol.182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields, editor, Meth. Enzymol., Vol. 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99 (1990); Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1:255-60 (1995); y Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. 44:1326-31 (1996). A continuación, el polipéptido purificado o sintetizado puede inyectarse, por ejemplo en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. El experto en la materia reconocerá que se encuentran disponibles muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo tal como se describe en *Antibodies, A Laborator y Manual*, Harlow y Lane, editores, Cold Spring Harbor Laborator y, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). El experto en la materia apreciará además que también pueden prepararse fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan los anticuerpos (por ejemplo, que conservan las regiones de unión funcionales), a partir de información genética mediante diversos procedimientos. Ver, por ejemplo, *Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, editor, Oxford University Press, Oxford (1995); y Huse et al., J. Immunol., 149:3914-3920 (1992).

Además, numerosas publicaciones han informado de la utilización de la tecnología de expresión fágica para producir y cribar bibliotecas de polipéptidos para la unión a un antígeno diana seleccionado (ver, por ejemplo, Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382 (1990); Devlin et al., Science, 249:404-406 (1990); Scott et al., Science

249:386-388 (1990); y Ladner et al., patente U.S. N° 5,571,698). Un concepto básico de los métodos de expresión fágica es el establecimiento de una asociación física entre un polipéptido codificado por el ADN fágico y un antígeno diana. Esta asociación física es proporcionada por la partícula fágica, que expresa un polipéptido como parte de una cápside que envuelve el genoma fágico codificante del polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite el cribado en masa simultáneo de un gran número de fagos portadores de diferentes polipéptidos. Los fagos que expresan un polipéptido con afinidad para un antígeno diana se unen al antígeno diana y estos fagos son enriquecidos mediante cribado de afinidad para el antígeno diana. La identidad de los polipéptidos expresados a partir de estos fagos puede determinarse a partir de los genomas respectivos. Un polipéptido identificado por tener una afinidad de unión para un antígeno diana determinado puede ser sintetizado en masa por medios convencionales (ver, por ejemplo, la patente U.S. N° 6,057,098).

Los anticuerpos que se generan mediante estos métodos seguidamente pueden seleccionarse en primer lugar cribando para afinidad y especificidad con el polipéptido antigénico purificado de interés y, en caso necesario, comparando los resultados de afinidad y especificidad de los anticuerpos con los de otros polipéptidos antigénicos que se desea excluir de la unión. El procedimiento de cribado puede incluir la inmovilización de los polipéptidos antigénicos purificados en pocillos separados de las placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo o grupo de anticuerpos potencial seguidamente se introduce en los pocillos de microtitulación respectivos y se incuba durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas. A continuación, se lavan los pocillos de microtitulación y se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo antirratón conjugado con fosfatasa alcalina en el caso de que los anticuerpos cultivados sean anticuerpos de ratón) a los pocillos y se incuba durante aproximadamente 30 minutos y después se lava. Se añade sustrato a los pocillos y aparece una reacción de color en los que se encuentra presente anticuerpo que reacciona contra el polipéptido antigénico inmovilizado.

Los anticuerpos identificados de esta manera seguidamente pueden analizarse en mayor detalle para su afinidad y especificidad. Durante el desarrollo de los inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como estándar a partir de lo cual se evalúa la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo con los anticuerpos seleccionados. Debido a que la afinidad de unión de los diversos anticuerpos es variable, por ejemplo determinadas combinaciones de anticuerpos pueden interferir entre sí estéricamente, el rendimiento de ensayo del anticuerpo podría ser una medida más importante que la afinidad y especificidad absolutas de ese anticuerpo.

El experto en la materia reconocerá que pueden adoptarse muchos enfoques a la producción de anticuerpos o fragmentos de unión, así como al cribado y selección para afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos de interés, aun que estos enfoques no modifican el alcance de la presente invención.

A. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferentemente se cultivan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido de interés y un coadyuvante. Puede resultar útil conjugar el polipéptido de interés con una proteína portadora que resulte inmunogénica en la especie que debe inmunizarse, tal como, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante. Entre los ejemplos no limitativos de agentes bifuncionales o derivatizantes se incluyen el éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación mediante residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (conjugación mediante residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , y $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el polipéptido de interés o contra un conjugado o derivado inmunogénico del mismo mediante combinación con, por ejemplo, 100 μg (conejos) ó 5 μg (ratones) del antígeno o conjugado con 3 volúmenes de coadyuvante completo de Freund y la inyección de la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo de aproximadamente 1/5 a 1/10 de la cantidad original de polipéptido o conjugado en coadyuvante incompleto de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a catorce días después, se extraen muestras de sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para el título de anticuerpos. Los animales típicamente reciben un refuerzo hasta que el título alcanza un nivel estable. Preferentemente el animal recibe un refuerzo de conjugado del mismo polipéptido, aunque puede utilizarse un conjugado con una proteína inmunogénica diferentes y/o utilizar un reactivo de entrecruzamiento diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante en forma de proteínas de fusión. En determinados casos, pueden utilizarse agentes agregantes tales como alúmina para intensificar la respuesta inmunológica.

B. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen generalmente a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden encontrarse presentes en cantidades reducidas. De esta manera, el modificador "monoclonal" caracteriza al anticuerpo como no formando una mezcla de anticuerpos discretos. Por

ejemplo, pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando el método del hibridoma descrito por Kohler et al., Nature 256:495 (1975), o mediante cualquier método de ADN recombinante conocido de la técnica (ver, por ejemplo, la patente U.S. N° 4,816,567) .

5 En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado (por ejemplo, un hámster) tal como se ha indicado anteriormente para inducir los linfocitos que producen o que son capaces de producir los anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de interés utilizado para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se inmunizan *in vitro*. A continuación, los linfocitos inmunizados se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar células de hibridoma (ver, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, páginas 59-103 (1986)). Las células de hibridoma preparadas de esta manera se sembraron y cultivaron en un medio de cultivo adecuado que contenía preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, en el caso de que las células de mieloma parental no presenten el enzima hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa (HGPRT), el medio de cultivo de las células de hibridoma típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), los cuales evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma preferentes son aquéllas que se fusionan eficientemente, dan soporte a una producción estable de nivel elevado de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y/o son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre los ejemplos de dichas líneas celulares preferentes de mieloma para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, líneas de mieloma murino tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 (disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA), SP-2 ó células X63-Ag8-653 (disponibles de la American Type Culture Collection, Rockville, MD) y líneas celulares de mieloma humano o de heteromieloma de ratón-humano (ver, por ejemplo, Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984) y Brodeur et al., "Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications", Marcel Dekker, Inc., New York, páginas 51-63 (1987).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma crecen puede someterse a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de interés. La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina preferentemente mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). La afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales puede determinarse utilizando, por ejemplo, el análisis de Scatchard de Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980).

Tras identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y se cultivan mediante métodos estándares (ver, por ejemplo, "Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice", Academic Press, páginas 59-103 (1986). Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* en forma de tumores ascites en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse a partir del medio de cultivo, ascites líquido o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN codificante de los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que sean capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma pueden servir como fuente preferente de dicho ADN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producirían anticuerpos, con el fin de inducir la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped recombinantes. Ver, por ejemplo, Skerra et al., Curr. Opin. Immunol. 5:256-262 (1993); y Pluckthun, Immunol. Rev. 130:151-188 (1992). El ADN también puede modificarse, por ejemplo mediante sustitución por las secuencias codificantes de los dominios constantes de cadenas pesadas y ligeras humanas de las secuencias murinas homólogas (ver, por ejemplo, la patente U.S. N° 4,816,567 y Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984) o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulina.

En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990); Clackson et al., Nature 352:624-628, (1991), y Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991). La producción de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad (orden de nM) mediante intercambio de cadenas se describe en Marks et al., Biotechnology 10:779-783 (1992). La utilización de la infección

combinatorial y la recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de bibliotecas fágicas de gran tamaño se describe en Waterhouse et al., Nuc. Acids Res. 21:2265-2266 (1993). De esta manera, dichas técnicas son alternativas viables a los métodos tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para la generación de anticuerpos monoclonales.

5

C. Anticuerpos humanizados

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos de la técnica. Preferentemente se introducen uno o más residuos aminoácidos en un anticuerpo humanizado a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", que típicamente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente mediante sustitución de secuencias de región hipervariable de un anticuerpo no humano por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Ver, por ejemplo, Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); y Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (ver, por ejemplo, la patente U.S. Nº 4,816,567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de región hipervariable y posiblemente algunos residuos de región marco (FR) se sustituyen por residuos procedentes de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

10

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que deben utilizarse en la preparación de los anticuerpos humanizados indicados en la presente memoria es una consideración importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "de ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana más similar a la de roedor seguidamente es aceptada como la FR humana para el anticuerpo humanizado (ver, por ejemplo, Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993), y Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). Otro método utiliza una FR particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras y pesadas. Puede utilizarse la misma FR para varios anticuerpos humanizados diferentes (ver, por ejemplo, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992) y Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)).

15

También resulta importante que los anticuerpos se humanicen conservando la afinidad elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, pueden prepararse anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se encuentran normalmente disponibles y resultarán familiares al experto en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras probables de conformación tridimensional de secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR procedentes de secuencias del receptor e importadas, de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable participan directa y específicamente en influir sobre la unión de antígeno.

20

Se encuentran contempladas por la presente invención diversas formas de anticuerpos humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgA, IgG o IgM intacto.

25

D. Anticuerpos humanos

A modo de alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. En algunas realizaciones, pueden producirse animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de región de unión (JH) de cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la inhibición total de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto antigénico. Ver, por ejemplo, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immun. 7:33 (1993), y patentes U.S. Nos. 5,591,669, 5,589,369 y 5,545,807.

30

Alternativamente, puede utilizarse la tecnología de expresión fágica (ver, por ejemplo, McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, utilizando repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulina procedentes de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el mismo marco de un gen de proteína mayor o menor de cubierta de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan en forma de fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula fágica. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma fágico, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en que la selección del gen codificante del anticuerpo muestre también estas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Puede llevarse a cabo la expresión fágica en una diversidad de formatos, tal como se describe en, por ejemplo, Johnson et al., Curr. Opin. Struct. Biol. 3:564-571 (1993). Pueden utilizarse varias fuentes de segmentos génicos V para la expresión fágica. Ver, por ejemplo, Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991). Puede construirse un repertorio de genes V procedente de donantes humanos no humanizados y pueden aislarse anticuerpos contra un abanico amplio de antígenos (incluyendo autoantígenos), siguiendo esencialmente las técnicas descritas en Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991); Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993), y las patentes U.S. Nos. 5,565,332 y 5,573,905.

En determinados casos, los anticuerpos humanos pueden ser generados por células B activadas *in vitro*, tal como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 5,567,610 y 5,229,275.

20 E. Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth. 24:107-117 (1992), y Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente utilizando células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de las bibliotecas fágicas de anticuerpos comentadas anteriormente. Alternativamente, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH directamente a partir de células de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (ver, por ejemplo, Carter et al., BioTechnology 10:163-167 (1992)). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de un cultivo de células huésped recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Ver, por ejemplo, la solicitud de patente PCT publicación nº WO 93/16185, y las patentes U.S. Nos. 5,571,894 y 5,587,458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal tal como se describe en, por ejemplo, la patente U.S. Nº 5,641,870. Estos fragmentos lineales de anticuerpo pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

F. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que presentan especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes del mismo polipéptido de interés. Otros anticuerpos biespecíficos pueden combinar un sitio de unión para el polipéptido de interés con uno o más sitios de unión para uno o más antígenos adicionales. Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos en forma de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos de la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas presentan especificidades diferentes (ver, por ejemplo, Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)). Debido a la colección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que únicamente una presenta la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta habitualmente se lleva a cabo mediante cromatografía de afinidad. Se dan a conocer procedimientos similares en la solicitud de patente PCT publicación No. WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

Según otro enfoque, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones CH2 y CH3 de bisagra. Resulta preferente que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera se encuentre presente en por lo menos una de las fusiones. El ADN codificante de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Lo anterior proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los

tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en el caso de que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionen los rendimientos óptimos. Sin embargo, resulta posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión en el caso de que la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales resulte en rendimientos elevados o en el caso de que las proporciones no resulten particularmente significativas.

En una realización preferente de dicho enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado respecto de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Ver, por ejemplo, la solicitud de patente PCT publicación No. WO 94/04690, y Suresh et al., Meth. Enzymol. 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en la patente U.S. No. 5,731,168, la interfaz entre una pareja de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferente comprende por lo menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se sustituye una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales de mayor tamaño (por ejemplo, de tirosina o de triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño igual o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo, de alanina o de treonina). Lo anterior proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento de heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina y el otro, a biotina. Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos de la técnica y se dan a conocer en, por ejemplo, la patente U.S. No. 4,676,980.

También son conocidos de la técnica procedimientos adecuados para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando el enlace químico. En determinados casos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos mediante un procedimiento en el que se cortan proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂ (ver, por ejemplo, Brennan et al., Science 229:81 (1985)). Estos fragmentos se reducen en presencia del agente acomplejante ditiol arsenito sódico para estabilizar los ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados seguidamente se convierten en derivados tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

En algunas realizaciones, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, puede producirse una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ totalmente humanizada mediante los métodos descritos en Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992). Cada fragmento Fab' se secretó separadamente de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido in vitro para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucinas. Ver, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucinas de las proteínas Fos y Jun se unen a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra formando monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (scFv) se describe en Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

Los anticuerpos con más de dos valencias también se encuentran contemplados. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Ver, por ejemplo, Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

G. Purificación de anticuerpos

5 Al utilizar técnicas recombinantes, pueden producirse anticuerpos en el interior de una célula huésped aislada, en el espacio periplasmático de una célula huésped, o secretarse directamente de una célula huésped al medio. En el caso de que el anticuerpo se produzca intracelularmente, en primer lugar se eliminan los residuos particulados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., BioTech. 10:163-167 (1992), describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, se descongela pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. En el caso de que el anticuerpo se secrete al medio, los sobrenadantes de estos sistemas de expresión generalmente se concentran utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriormente indicadas, con el fin de inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

20 La composición de anticuerpos preparada a partir de células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que se encuentre presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que estén basados en las cadenas pesadas 1, 2 ó 4 humanas (ver, por ejemplo, indmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983) . Protein G is recommended for all mouse isotypes and for human 3 (see, e.g., Guss et al., EMBOJ., 5:1567-1575 (1986). La matriz a la que se une el ligando de afinidad con la mayor frecuencia es agarosa, aunque se encuentran disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o el poli (estirendivinil) benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los conseguidos con la agarosa. En el caso de que el anticuerpo comprenda un dominio CH3, para la purificación resulta útil la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Se encuentran disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía en sílice, la cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, la cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico) , el cromatofoco, SDS-PAGE y la precipitación con sulfato amónico, dependiendo del anticuerpo que debe recuperarse.

35 Tras cualquier etapa o etapas preliminares de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando una solución tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5-4,5, preferentemente llevada a cabo a concentraciones salinas bajas (por ejemplo, de entre aproximadamente 0-0,25 M de sal).

40 El experto en la materia apreciará que cualquier molécula de unión que presente una función similar a la de un anticuerpo, por ejemplo, una molécula de unión o pareja de unión que sea específica para uno o más analitos de interés en una muestra, también puede utilizarse en los métodos y composiciones de la presente invención. Entre los ejemplos de moléculas de tipo anticuerpo adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, anticuerpos de dominio, unicuerpos, nanocuerpos, proteínas reactivas con antígenos de tiburón, avimeros, adnectinas, anticalms, ligandos de afinidad, filómeros, aptámeros, aficuerpos, trinectinas, y similares.

VIII. Métodos de administración

50 Los fármacos anticáncer descritos en la presente memoria están destinados a la administración en un sujeto mediante cualquier medio conveniente conocido de la técnica. Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para seleccionar un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor (por ejemplo, un tumor de pulmón) en un sujeto. Los métodos de la invención también pueden utilizarse para identificar la respuesta de un tumor (por ejemplo, un tumor de pulmón) en un sujeto al tratamiento con un fármaco anticáncer o con una combinación de fármacos anticáncer. Además, los métodos de la invención pueden utilizarse para predecir la respuesta de un sujeto que presenta un tumor (por ejemplo, un tumor de pulmón) al tratamiento con un fármaco anticáncer o con una combinación de fármacos anticáncer. El experto en la materia apreciará que los fármacos anticáncer indicados en la presente memoria pueden administrarse solos o como parte de un enfoque terapéutico combinado con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y/o cirugía convencionales.

60 En determinadas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente antiseñalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa, un agente antiproliferación, un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico), un agente terapéutico hormonal, un agente

radioterapéutico, una vacuna y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular el crecimiento incontrolado de células aberrantes tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, el sujeto se trata con uno o más agentes antiseñalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con por lo menos un agente quimioterapéutico. Se han descrito anteriormente anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes antiproliferativos, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas ejemplares.

Los fármacos anticáncer descritos en la presente memoria pueden ser co-administrados con agentes terapéuticos hormonales convencionales, los cuales incluyen aunque no de forma limitativa, esterodes (por ejemplo, dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasas, tamoxifen, y agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) tal como goserelina.

En algunas realizaciones, los fármacos anticáncer indicados en la presente memoria pueden co-administrarse con agentes inmunoterapéuticos convencionales, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, inmunoestimuladores (por ejemplo, bacilo Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleuquina 2, alfa-interferón, etc.), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22 exotoxina de *Pseudomonas*, etc.) y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ^{111}In , ^{90}Y ó ^{131}I , etc.).

Los fármacos anticáncer pueden administrarse con un excipiente farmacéutico adecuado según resulte necesario y la administración puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los modos de administración aceptados. De esta manera, la administración puede ser, por ejemplo, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intraarticular, parenteral, intraarteriolar, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intravesical, intratecal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal o mediante inhalación. El término "co-administrarse" se refiere a que un fármaco anticáncer se administra simultáneamente, justo antes o justo después de la administración de un segundo fármaco (por ejemplo, otro fármaco anticáncer, un fármaco útil para reducir los efectos secundarios asociados a la terapia con fármaco anticáncer, un agente radioterapéutico, un agente terapéutico hormonal, un agente inmunoterapéutico, etc.).

Una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco anticáncer puede administrarse repetidamente, por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó más veces, o la dosis puede administrarse mediante infusión continua. La dosis puede adoptar la forma de sólido, semisólido, polvos liofilizados o formas de dosificación líquida tales como, por ejemplo, tabletas, píldoras, pellets, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas o similares, preferentemente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración simple de dosis exactas.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas que resultan adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco anticáncer calculado para producir el inicio, tolerabilidad y/o efectos terapéuticos deseados, asociada a un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, pueden prepararse formas de dosificación concentrada a partir de la que pueden producirse las formas de dosificación unitaria más diluidas. De esta manera, las formas de dosificación más concentradas contendrán sustancialmente más de, por ejemplo, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó más veces la cantidad del fármaco anticáncer.

Los métodos para preparar dichas formas de dosificación son conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18a edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Entre las formas de dosificación típicamente se incluyen un portador o excipiente farmacéutico convencional y adicionalmente puede incluir otros agentes medicinales, portadores, adyuvantes, diluyentes, intensificadores de la permeación en tejidos, solubilizadores y similares. Pueden adaptarse excipientes apropiados a la forma de dosificación particular y a la vía de administración mediante métodos bien conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, supra).

Entre los ejemplos de excipientes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos, tales como carbopoles, por ejemplo Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Entre las formas de dosificación pueden incluirse adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metilhidroxibenzoatos, etilhidroxibenzoatos y propilhidroxibenzoatos (es decir, los parabenos); agentes de ajuste del pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes y agentes saborizantes. Las formas de dosificación pueden comprender además perlas de polímero biodegradable, dextrano y complejos de inclusión con ciclodextrina.

5 Para la administración oral, la dosis terapéuticamente efectiva puede encontrarse en forma de tabletas, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, sprays, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Entre los excipientes adecuados para la administración oral se incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

10 En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente efectiva adopta la forma de una píldora, tableta o cápsula, y de esta manera, la forma de dosificación puede contener, conjuntamente con un fármaco anticáncer, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y similares; un desintegrante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un ligante tal como almidón, goma acacia, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. También puede formularse un fármaco anticáncer en forma de supositorio dispuesto, por ejemplo, en un portador de polietilenglicol (PEG).

15 Las formas de dosificación líquidas pueden prepararse mediante disolución o dispersión de un fármaco anticáncer y opcionalmente uno o más coadyuvantes farmacéuticamente aceptables en un portador tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, cloruro sódico al 0,9% p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para la administración oral, tópica o intravenosa. También puede formularse un fármaco anticáncer en un enema de retención.

20 Para la administración tópica, la dosis terapéuticamente efectiva puede encontrarse en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, soluciones, suspensiones, pomadas y parches transdérmicos. Para la administración mediante inhalación, puede administrarse un fármaco anticáncer en forma de polvos secos o en forma líquida mediante un nebulizador. Para la administración parenteral, la dosis terapéuticamente efectiva puede encontrarse en forma de soluciones inyectables estériles y de polvos empaquetados estériles. Preferentemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,5.

25 La dosis terapéuticamente efectiva también puede proporcionarse en una forma liofilizada. Dichas formas de dosificación pueden incluir una solución tampón, por ejemplo, bicarbonato, para la reconstitución previa a la administración, o la solución tampón puede incluirse en la forma de dosificación liofilizada para la reconstitución con, por ejemplo, agua. La forma de dosificación liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo epinefrina. La forma de dosificación liofilizada puede proporcionarse en una jeringa, opcionalmente empaquetada en combinación con la solución tampón para la reconstitución, de manera que la forma de dosificación reconstituida pueda administrarse inmediatamente en un sujeto.

30 También puede realizarse un seguimiento del sujeto a intervalos de tiempo periódicos con el fin de evaluar la eficacia de un régimen terapéutico determinado. Por ejemplo, pueden cambiar los estados de activación de determinadas moléculas de transducción de señales basándose en el efecto terapéutico del tratamiento con uno o más de los fármacos anticáncer indicados en la presente memoria. Puede realizarse un seguimiento del sujeto con el fin de evaluar la respuesta y comprender los efectos de determinados fármacos o tratamientos en un enfoque personalizado. Además, los sujetos que responden inicialmente a un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer específico pueden hacerse refractarios al fármaco o combinación de fármacos, lo que indica que estos sujetos han desarrollado una resistencia adquirida a fármaco. En estos sujetos se puede interrumpir la terapia a la que están sometidos y prescribirse un tratamiento alternativo según los métodos de la presente invención.

35 En ciertos otros casos, los métodos de desarrollo de inmunoensayos de alto rendimiento multiplexados y las matrices de proteínas se describen en WO 2008/036802. La aplicación describe entre otras matrices basadas en anticuerpos para detectar los estados de activación y/o la cantidad total de una pluralidad de moléculas de transducción de señales en células circulantes raras y los métodos de uso de matrices para facilitar la prognosis y el diagnóstico del cáncer y el diseño de terapias personalizadas dirigidas. La aplicación además describe una superficie soporte que comprende una pluralidad de moléculas de captura retenidas en una matriz codificada o direccionable. Cada región distinta de la matriz comprende un único agente de captura que se une específicamente a la etiqueta de captura presente en el anticuerpo de detección independiente del estado de activación o en el anticuerpo dependiente del estado de activación, de este modo se retienen y organizan los anticuerpos de detección etiquetados en la matriz. En una realización preferente, los agentes de captura y las etiquetas de captura son oligonucleótidos que hibridan específicamente unos con otros.

IX. Ejemplos

60 Los ejemplos siguientes se proporcionan a fin de ilustrar, aunque sin limitación, la invención reivindicada. Ejemplo 1. Aislamiento, estimulación y lisis de células circulantes.

Las células circulantes de un tumor sólido comprenden células que han metastizado o micrometastizado a partir de un tumor sólido y entre ellas se incluyen las células tumorales circulantes (CTCs), las células madre cancerosas (CSCs) y/o las células que migran al tumor (por ejemplo, las células progenitoras endoteliales circulantes (CEPs), las células endoteliales circulantes (CECs), las células mieloides proangiogénicas circulantes, las células dendríticas circulantes, etc.). Las muestras de paciente que contienen células circulantes pueden obtenerse de cualquier líquido biológico accesible (por ejemplo, sangre, orina, líquido aspirado del pezón, linfa, saliva, líquido aspirado con aguja fina, etc.). Las células circulantes pueden aislarse a partir de una muestra de paciente utilizando uno o más métodos de separación tales como, por ejemplo, la separación inmunomagnética (ver, por ejemplo, Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer 92:577-582 (2001), el sistema CellTrack™ de Immunicon (Huntingdon Valley, PA), la separación de microfluidos (ver, por ejemplo, Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al., nº de resumen 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (ver, por ejemplo, Mancuso et al., Blood 97:3658-3661 (2001)), la centrifugación en gradiente de densidad (ver, por ejemplo, Baker et al., Clin. Cancer-Res., 13:4865-4871 (2003)) y los métodos de remoción (ver, por ejemplo, Meye et al., Int. J. Oncol., 21:521-530 (2002)).

Aislamiento manual de las CTCs:

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

- 1) Se utilizan perlas magnéticas (Dynal M450, Dynal AS, Oslo, Noruega) que han sido previamente conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM (Kordia Life Sciences, Leiden, Países Bajos).
- 2) Inmediatamente antes de la utilización, las perlas Dynabeads prerrecubiertas se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.
- 3) Se añaden 25 µl de las Dynabeads prerrecubiertas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a una temperatura de entre 2-8°C con balanceo y rotación suave.
- 5) El tubo se introduce en el separador magnético (imán MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se descarta el sobrenadante y las células unidas a las perlas se lavan tres veces mediante resuspensión en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.
- 7) La muestra se resuspende en 100 µl de solución tampón de estimulación.

Preparación de las muestras:

- 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3-5 ml se descartan para evitar la contaminación con células epiteliales liberadas de la vena punzada.
- 2) Se diluye 1 ml de sangre completa 1:3 con NaCl al 0,9% previamente a la utilización.

Preparación del control:

- 1) Se preparan controles de línea celular mediante la adición de pulsos de líneas celulares cancerosas humanas a células HL-60.
- 2) Se emplean controles de línea celular a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml.

Aislamiento manual de CECs y CEPCs:

A título de ejemplo no limitativo, las CECs y CEPCs viables pueden aislarse utilizando la técnica de aislamiento/enriquecimiento inmunomagnético descrita en Beerepoot et al., Ann. Oncology 15:139-145 (2004). Brevemente, se incuba sangre periférica con perlas magnéticas (Dynal M450 IgG₁) que ha sido conjugada previamente con un anticuerpo monoclonal anti-CD146 (Kordia Life Sciences). Este anticuerpo reconoce todos los linajes de las células endoteliales pero no las células hematopoyéticas o epiteliales, en la sangre periférica (George et al., J. Immunol. Meth. 139:65-75 (1991)). La selección negativa de las células hematopoyéticas y epiteliales puede utilizarse previamente a la selección positiva con perlas magnéticas conjugadas con anticuerpos apropiados (por ejemplo, perlas Dynal-CD45 para la remoción de leucocitos; perlas Dynal-CD14 para la remoción de monocitos, Dynal-EpCAM para la remoción de células epiteliales (Invitrogen, Carlsbad, CA)). En el presente ejemplo únicamente se utilizó la selección positiva.

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

- 1) Se utilizan perlas magnéticas (Dynal M450) que han sido previamente conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti-CD146 (Kordia Life Sciences).
- 2) Inmediatamente antes de la utilización, las perlas Dynabeads prerrecubiertas se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.
- 3) Se añaden 25 µl de las Dynabeads prerrecubiertas a 1 ml de la muestra.

- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a una temperatura de entre 2-8°C con balanceo y rotación suave.
- 5) El tubo se introduce en el separador magnético (imán MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se descarta el sobrenadante y las células unidas a las perlas se lavan tres veces mediante resuspensión en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.
- 5 7) La muestra se resuspende en 100 µl de solución tampón de estimulación.

Preparación de las muestras:

- 10 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3-5 ml se descartan para evitar la contaminación con células endoteliales liberadas de la vena punzada.
- 2) se diluye 1 ml de sangre completa 1:3 con NaCl al 0,9% previamente a la utilización.

Preparación del control:

- 15 1) Se preparan controles de línea celular mediante la adición de pulsos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a células HL-60.
- 2) Se emplean controles de línea celular a una concentración de $2,5 \times 10^6$ células/ml.

Aislamiento manual de CEPCs (sin CECs):

- 20 Las CEPCs son un subtipo circulante de células progenitoras derivadas de la médula ósea que presentan la capacidad de diferenciarse en células endoteliales maduras en respuesta a diversos factores de crecimiento angiogénico. Las CEPCs pueden aislarse mediante selección con anticuerpos que reconocen el marcador de superficie CD34. CD133 es un marcador de superficie que diferencia las células progenitoras endoteliales inmaduras (CPEs) o las células madre hematopoyéticas primitivas (HSCs) de las CEPCs. Se han descrito diversos procedimientos de aislamiento de las CEPCs a partir de diferentes fuentes mediante cultivo en adherencia o microperlas magnéticas. En el presente ejemplo, se utilizó un protocolo modificado a partir del descrito en Asahara et al., Science 275:964-967 (1997).
- 25

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

- 1) Se utilizan perlas magnéticas (DynaM450 CD34). Estas perlas se encuentran recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de superficie CD34.
- 2) Inmediatamente antes de la utilización, las perlas Dynabeads prerrecubiertas se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.
- 3) Se añaden 25 µl de las Dynabeads prerrecubiertas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a una temperatura de entre 2-8°C con balanceo y rotación suave.
- 5) El tubo se introduce en el separador magnético (imán MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se descarta el sobrenadante y las células unidas a las perlas se lavan tres veces mediante resuspensión en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.
- 40 7) La muestra se resuspende en 100 µl de solución tampón de estimulación.

Preparación de las muestras:

- 45 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3-5 ml se descartan para evitar la contaminación con células endoteliales liberadas de la vena punzada.
- 2) Se diluyen 10 ml de sangre 1:1 con una solución salina equilibrada.
- 3) Se añade una capa de 4 ml de sangre diluida sobre 3 ml de Ficoll-Paque en tubos de 10 ml.
- 4) Los tubos se centrifugan a 400xg durante 30-40 minutos a una temperatura de entre 18-20°C.
- 50 5) Se separa mediante aspiración la capa superior, que contiene plasma y plaquetas, utilizando una pipeta Pasteur estéril, dejando la capa de células mononucleares intacta en la interfaz.
- 6) Las células mononucleares se transfieren a un tubo de centrifuga estéril utilizando una pipeta estéril.
- 7) Se añaden 6 ml de solución salina equilibrada y las células se resuspenden suavemente.
- 8) La mezcla se centrifuga a 60-100xg durante 10 minutos a una temperatura de entre 18-20°C.
- 55 9) Se separa el sobrenadante y las células mononucleares de cada tubo se resuspenden en 1 ml de PBS.

Aislamiento celular de CTCs, CECs y CEPCs utilizando el sistema Veridex:

- 60 Veridex (Warren, NJ) ha comercializado el sistema CellSearch, que consiste del sistema CellPrep, el kit de células epiteliales CellSearch y el analizador CellSpotter. El sistema CellPrep es un sistema de preparación de muestras semiautomático (Kagan et al., J. Clin. Ligand Assay 25:104-110 (2002)). El kit de células epiteliales CellSearch consiste en: ferrofluidos recubiertos con anticuerpos anti-EpCAM específicos para células epiteliales, anticuerpos conjugados con ficoeritrina contra las citoqueratinas 8, 18 y 19, un anticuerpo anti-CD45 conjugado con

aloficocianina, pigmento DAPI y soluciones tampón para el lavado, permeabilización y resuspensión de las células. El protocolo utilizado en el presente ejemplo también se describe en Allard et al., Clin. Cancer Res. 10:6897-6904 (2004). El sistema Veridex completo puede utilizarse para la enumeración de CTC o, mediante la extracción manual de la muestra tras el aislamiento con el sistema CellPrep, puede proporcionar un método de aislamiento previo al análisis para la activación de rutas. El número de CTCs puede ser informativo para el desarrollo de un algoritmo.

Sistema Veridex-enriquecimiento en CTC seguido del recuento:

- 1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de solución tampón, se centrifuga a 800xg durante 10 minutos y después se introducen en el sistema CellTracks® AutoPrep®.
- 2) Tras aspirar el instrumento el sobrenadante, el instrumento añade los ferrofluidos.
- 3) El instrumento lleva a cabo la incubación y posterior etapa de separación magnética.
- 4) Las células no unidas y el plasma restante son aspirados.
- 5) Se añaden reactivos de tinción conjuntamente con la solución tampón de permeabilización para la tinción de fluorescencia.
- 6) Tras la incubación por el sistema, nuevamente se separan las células magnéticamente y se resuspenden en el dispositivo de presentación celular MagNest®.
- 7) A continuación, el dispositivo de presentación celular MagNest® se introduce en el analizador CellTracks®, un microscopio de fluorescencia semiautomático de cuatro colores.
- 8) Se capturan las imágenes que cumplen los criterios definidos de Veridex y se muestran mediante un explorador en Internet para la selección manual final.
- 9) Los resultados del recuento celular se expresan como número de células por cada 7,5 ml de sangre.

Sistema Veridex-enriquecimiento en CTC seguido de un ensayo de activación:

- 1) 7,5 ml de sangre se mezclan con 6 ml de solución tampón, se centrifuga a 800xg durante 10 minutos, y se ponen en el sistema CellPrep.
- 2) Después que el instrumento aspira el sobrenadante, el instrumento añade los ferrofluidos.
- 3) El instrumento lleva a cabo la incubación y posterior etapa de separación magnética.
- 4) Las células no unidas y el plasma restante son aspirados.
- 5) La muestra se resuspende en 100 µl de una solución tampón de estimulación.

Sistema Veridex-enriquecimiento en CEC y CPEC seguido de un ensayo de activación:

- 1) Veridex ofrece un kit de células endoteliales CellTracks que utiliza la captura con un anticuerpo anti-CD146. El kit de células endoteliales CellTracks se utiliza conjuntamente con el sistema Veridex CellTracks AutoPrep para la preparación de muestras de sangre y el analizador CellTracks para el recuento y caracterización de las CECs y CPECs en sangre completa. El protocolo es el mismo que para el kit de células epiteliales CellSearch.

Preparación de las muestras:

- 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en el tubo de conservación CellSave siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primeros 3-5 ml se descartan para evitar la contaminación con células epiteliales o endoteliales liberadas de la vena punzada.

Aislamiento manual de las CSCs:

Se acumulan los datos que indican que los tumores contienen una pequeña población de células madre cancerosas putativas con mecanismos de autorenovación y supervivencia únicos (ver, por ejemplo, Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 51:1-28 (2004); Reya et al., Nature 414:105-111 (2001); Dontu et al., Trends Endocrinol. Metab. 15:193-197 (2004); y Dick, Nature 423:231-233 (2003)). Las células madre cancerosas (CSCs) pueden existir en un estado quiescente durante un tiempo prolongado, lo que las hace resistentes a fármacos quimioterapéuticos con diana en células en división. Esta población iniciadora del cáncer puede caracterizarse con el fin de activar las rutas de autorenovación y supervivencia que se someterán a terapia dirigida para su eliminación selectiva. Se han descrito procedimientos de aislamiento de las CSCs utilizando el cultivo en adherencia o las microperlas magnéticas. En el presente ejemplo, se utilizó un protocolo modificado a partir del descrito en Cote et al., Clin. Can. Res. 12:5615 (2006).

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

- 1) Se utilizan perlas magnéticas (DynaL AS, Oslo, Noruega). Estas perlas se encuentran recubiertas con un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de superficie CD34 ó CD133.

2) Inmediatamente antes de la utilización, las perlas Dynabeads prerrecubiertas se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.

3) Se añaden 1-10⁷ Dynabeads prerrecubiertas a 3 ml de la muestra.

4) La mezcla se incuba durante 60 minutos a una temperatura de entre 2-8°C con balanceo y rotación suave.

5) La mezcla se divide en porciones de 1 ml y cada tubo se introduce en el separador magnético (imán MPL-1) durante por lo menos 6 minutos.

6) Se descarta el sobrenadante y las células unidas a las perlas se lavan tres veces mediante resuspensión en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.

7) La muestra se resuspende en 100 µl de solución tampón de estimulación.

10

Preparación de las muestras:

1) Se obtienen especímenes de médula ósea de pacientes de cáncer mamario temprano tras obtener el consentimiento informado del paciente.

15) 2) Se lleva a cabo el procesamiento de los aspirados de médula ósea tal como se describe en Bauer et al., Clin. Can. Res. 6:3552-3559 (2000). La fracción de células mononucleares que contiene cualesquiera células tumorales diseminadas se enriquece mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque utilizando una centrífuga Beckman GS-6 a 4.000 xg durante 35 minutos y se lava dos veces con PBS.

20 Estimulación y lisis celular de CTCs aisladas:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

30) 1) La muestra se incuba con herceptina, lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, las células se estimulan mediante la adición de los factores TGF-α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) a las células y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

35) Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

1) La muestra se incuba con herceptina, lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, las células se estimulan con TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

40

Las CTCs estimuladas se lisan utilizando el protocolo siguiente:

1) Se prepara una solución tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 2.

2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 µl de solución tampón frío.

45) 3) La incubación se lleva a cabo sobre hielo durante 30 minutos.

4) La mezcla se centrifuga en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 10 minutos para separar las perlas del lisado.

5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

50) Tabla 2

Receta tampón de lisis (10 ml)			
Reactivos	Concentración solución madre	Concentración final	Volumen
Triton X-100 al 10%	10	1	1,00
Tris 1 M, pH 7,5	1	0,05	0,05
NaF 1 M	1	0,05	0,05
NaCl 5 M	5	0,1	0,20
B-glicerolfosfato 2 M	1	0,05	0,50

Na ₃ VO ₄ 0,1 M	0,1	0,001	0,10
Pepstatina 1 mg/ml	1	0,10	
Mini-proteasa completa			1 Tableta
EDTA 0,5 M	0,5	0,005	0,10
(continuación)			
		Total (ml)	3,00
		Agua (ml)	7,00

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

5 Se cree que el VEGF estimula la supervivencia al activar las rutas antiapoptóticas tanto en las CEPCs (Larrivee et al., J. Biol. Chem. 278:22006-22013 (2003)) como en CECs maduras que se han desprendido de la pared vascular (Solovey et al., Blood 93:3824-3830 (1999)). El VEGF también puede estimular la proliferación de las CEPCs o de las CECs maduras, aunque las CECs maduras aparentemente sólo presentan una capacidad proliferativa limitada en comparación con las CEPCs (Lin et al., J. Clin. Invest. 105:71-77 (2000)). Por estos motivos, las CECs y/o las CEPCs resultan activadas al incubarlas con factores de crecimiento de la familia del VEGF antes de la lisis.

10 Estimulación celular:

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

15 Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Avastina, Nexavar, Sutent y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

20 2) A continuación, se añaden los factores de crecimiento VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o Ang, cada uno a 100 nM, y se incuba a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

25 1) La muestra se incuba con Avastina, Nexavar, Sutent y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o Ang, cada uno a 100 nM, y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

30 Las células CECs y/o CEPCs aisladas se lisan utilizando el protocolo siguiente:

1) Se prepara una solución tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 2.

2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 µl de una solución tampón frío.

3) La incubación se lleva a cabo sobre hielo durante 30 minutos.

35 4) La mezcla se centrifuga en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 10 minutos para separar las perlas del lisado.

5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

40 Estimulación y lisis celulares de CSCs aisladas:

Estimulación celular:

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

45 Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

50

2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de los factores TGF- α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de los factores TGF- α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células CSC estimuladas se lisan aplicando el protocolo siguiente:

1) Se prepara una solución tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 2.

2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 μ l de solución tampón frío.

3) La incubación se lleva a cabo sobre hielo durante 30 minutos.

4) La mezcla se centrifuga en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 10 minutos para separar las perlas del lisado.

5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

Ejemplo 2. Preparación de extractos de células tumorales a partir de tejidos, biopsia o cultivos primarios.

El presente ejemplo ilustra métodos para aislar, estimular y lisar células procedentes de especímenes de tejido tumoral o de biopsia. El presente ejemplo ilustra además métodos para iniciar, estimular y lisar cultivos primarios de células tumorales aisladas a partir de tejido, biopsia o sangre completa. Se describen métodos adicionales para aislar y cultivar células tumorales a partir de especímenes biológicos para el cribado de agentes quimioterapéuticos en, por ejemplo, las patentes U.S. Nos. 5,728,541; 6,416,967; 6,887,680; 6,900,027; 6,933,129 y 7,112,415; y en las publicaciones de patente U.S. Nos. 2004/0023375 y 2005/0202411. Los extractos celulares preparados según el presente ejemplo pueden utilizarse en los ensayos de detección individual o de proximidad indicados en la presente memoria.

Aislamiento de células tumorales a partir de tejidos primarios o metastásicos:

Aislamiento y cultivo celular:

1) Se extrajeron quirúrgicamente aproximadamente 5-100 mg de tejido tumoral no contaminado no necrótico y se introdujeron en una botella de 100 ml que contenía medio de cultivo celular estéril (por ejemplo RPMI-1640 con FBS al 10% y antibióticos).

2) Las muestras pueden almacenarse o transportarse a temperatura ambiente dentro de las primeras 72 horas desde la extracción.

3) Las muestras se enjuagan tres veces en medio de cultivo celular.

4) El tejido se corta en trozos pequeños con un escalpelo y después se desagrega formando una suspensión celular pasándolo a través de una malla fina de alambre.

5) Alternativamente, el tejido en trozos se trata con un cóctel que contiene Colagenasa II al 0,25% y ADNasa al 0,001% diluida en medio de cultivo celular sin suero que contiene antibióticos. La incubación se realiza durante 15-20 minutos bajo agitación suave. Se eliminan los enzimas tras el tratamiento mediante lavado 3 veces con medio de cultivo celular.

6) La concentración celular se ajusta 10^6 células/ml y las células se siembran en placas de 6 pocillos y se deja que sedimenten durante la noche. Al día siguiente, las células se tripsinizan y se siembran nuevamente en placas de microtitulación para la estimulación con ligandos y/o la inhibición con fármacos dirigidos.

Estimulación y lisis de células de tumores desagregados:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, las células se estimulan mediante la adición de los factores TGF- α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) a las células y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 5
- 1) La muestra se incuba con Herceptina, lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.
 - 2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de los factores TGF- α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

10 Las células estimuladas se lisan aplicando el protocolo siguiente:

- 1) Se prepara solución de tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 2, anteriormente.
- 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 μ l de solución tampón frío.
- 3) La incubación se lleva a cabo sobre hielo durante 30 minutos.
- 4) La mezcla se centrifuga en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 10 minutos para separar las perlas del lisado.
- 5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

20 Aislamiento de células tumorales procedentes de especímenes de biopsia:

Aislamiento y cultivo celulares:

- 1) Se extrajeron biopsias cilindro quirúrgicamente (2 cilindros con agujas de calibre 14, 3 cilindros con agujas de calibre 16 y 4 cilindros con agujas de calibre 18, con 1-2 biopsias para las asistidas por vacío) y se introdujeron en un vial estéril de 10 ml que contenía medio de cultivo celular tal como se realizó para los especímenes tumorales.
- 2) Las muestras pueden almacenarse o transportarse a temperatura ambiente dentro de las primeras 72 horas desde la extracción.
- 3) El material celular de las biopsias cilindro se desagregó formando una suspensión celular pasándolo por una malla de alambre fino.
- 4) Alternativamente, las biopsias pueden tratarse con un cóctel que contiene Colagenasa II al 0,25% y ADNasa al 0,001% diluida en medio de cultivo celular sin suero y con antibióticos. La incubación se realiza durante 15-20 minutos bajo agitación suave. Se eliminan las enzimas tras el tratamiento mediante lavado 3 veces con medio de cultivo celular.
- 5) La concentración celular se ajusta a 10⁶ células/ml y las células se siembran en placas de 6 pocillos y se dejan que sedimenten durante la noche. Al día siguiente, las células se tripsinizan y se siembran nuevamente en placas de microtitulación para la estimulación con ligandos y/o la inhibición con fármacos dirigidos.

Estimulación celular y lisis de células procedentes de biopsias:

- 40 Estimulación celular:
- 1) Se añaden los factores de crecimiento TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) a las células y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

- 45 Estimulación celular con tratamiento farmacológico:
- 1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.
 - 2) A continuación, las células se estimulan mediante la adición de los factores TGF- α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) a las células y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.
- 2) A continuación, las células se estimulan con TGF- α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

60 Las células estimuladas se lisan aplicando el protocolo siguiente:

- 1) Se prepara solución tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 2, anteriormente.

- 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 µl de una solución tampón frío.
- 3) La incubación se lleva a cabo sobre hielo durante 30 minutos.
- 4) La mezcla se centrifuga en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 10 minutos para separar las perlas del lisado.
- 5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

Preparación de cultivos primarios de células tumorales aisladas a partir de tejido, biopsia o sangre completa:

Cultivo celular:

- 1) Se cultivan células tumorales aisladas a partir de tejido, biopsia o sangre completa tal como se ha indicado anteriormente, en matraces estériles pequeños (por ejemplo T-25), placas Petri (por ejemplo de 10 mm) o placas (por ejemplo placas de 24 pocillos), dependiendo del número de células tumorales aisladas.
- 2) La incubación se realiza en medio de cultivo celular (por ejemplo RPMI-1640 con FBS al 2% y antibióticos) en una incubación humidificada a 37°C suplementada con 5% de CO₂. Con el tiempo, las células forman una monocapa sobre el fondo del recipiente y empiezan a dividirse. En el momento en que las células están próximas a la confluencia, se tripsinizan y se siembran nuevamente en placas de microtitulación para la estimulación con ligandos y/o la inhibición con fármacos dirigidos.

Estimulación y lisis celulares de cultivos primarios de células tumorales aisladas a partir de tejido, biopsia o sangre completa:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

- 1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.
- 2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de los factores TGF-α (100 nM) , Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 1) La muestra se incuba con Herceptina, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de Rapamicina a concentraciones terapéuticamente efectivas durante 30 minutos a 37°C.
- 2) A continuación, las células se estimulan con TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células estimuladas se lisan aplicando el protocolo siguiente:

- 1) Se prepara solución tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 2, anteriormente.
- 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 µl de una solución tampón frío.
- 3) La incubación se lleva a cabo sobre hielo durante 30 minutos.
- 4) La mezcla se centrifuga en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 10 minutos para separar las perlas del lisado.
- 5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

Ejemplo 3. ELISA en micromatriz de detección individual con amplificación de señales de tiramida.

El presente ejemplo ilustra un ELISA multiplex de alto rendimiento en micromatriz de detección individual que presenta un rango dinámico superior, que resulta adecuado para analizar los estados de activación de las moléculas de transducción de señales en células circulantes raras:

- 1) Se imprimió anticuerpo de captura sobre un portaobjetos FAST de 16 celdas (Whatman Inc., Florham Park, NJ) con una doble dilución.
- 2) Tras secar durante la noche, el portaobjetos se bloqueó con solución tampón de bloqueo de Whatman.
- 3) Se añadieron 80 µl de lisado celular a cada celda con una dilución en serie de 10 veces. Se incubó el portaobjetos durante dos horas a temperatura ambiente.

4) Tras seis lavados con TBS-Tween, se incubaron 80 µl de anticuerpo de detección marcado con biotina (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que reconozca pEGFR o un anticuerpo monoclonal que reconozca EGFR con independencia del estado de activación) durante dos horas a temperatura ambiente.

5) Tras seis lavados, se añadió peroxidasa de rábano picante marcada con estreptavidina (SA-HRP) y se incubó durante 1 hora para permitir que la SA-HRP se uniese al anticuerpo de detección marcado con biotina.

6) Para la amplificación de señales, se añadieron 80 µl de biotina-tiramida a una concentración de 5 µg/ml y se hicieron reaccionar durante 15 minutos. El portaobjetos se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.

7) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubaron durante 30 minutos. A continuación, se lavó el portaobjetos dos veces, se secó durante 5 minutos y se analizó en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA).

Ejemplo 4. ELISA en micromatriz de doble detección de proximidad con amplificación de señales de tiramida.

15 El presente ejemplo ilustra un ELISA multiplex de alto rendimiento en micromatriz de doble detección de proximidad que presenta un rango dinámico superior, que resulta adecuado para analizar los estados de activación de las moléculas de transducción de señales en células circulantes raras:

1) Se imprimió anticuerpo de captura sobre un portaobjetos FAST de 16 celdas (Whatman Inc.) con una dilución de entre 1 y 0,004 mg/ml.

2) Tras secar durante la noche, el portaobjetos se bloqueó con una solución tampón de bloqueo de Whatman.

3) Se añadieron 80 µl de lisado celular A431 a cada celda con una dilución en serie de 10 veces. Se incubó el portaobjetos durante dos horas a temperatura ambiente.

4) Tras seis lavados con TBS-Tween, se añadieron 80 µl de anticuerpos de detección para el ensayo de proximidad diluidos en TBS-Tween/BSA al 2%/FBS al 1% a los portaobjetos. Los anticuerpos de detección utilizados fueron: (1) un anticuerpo monoclonal anti-EGFR que se conjugó directamente con glucosa oxidasa (GO); y (2) un anticuerpo monoclonal que reconoce el EGFR fosforilado que se conjugó directamente con peroxidasa de rábano picante (HRP). La incubación fue de dos horas a temperatura ambiente.

5) Alternativamente, en la etapa de detección se utilizó un conjugado con biotina del anticuerpo monoclonal que reconocía el EGFR fosforilado. En estos casos, tras seis lavados se incluyó una etapa secuencial adicional de incubación con estreptavidina-HRP durante 1 hora.

6) Alternativamente, en la etapa de detección se utilizó un conjugado mediado por oligonucleótido con glucosa oxidasa (GO) del anticuerpo anti-EGFR. Se utilizó el conjugado de HRP conjugado directamente o mediante unión con biotina-estreptavidina (SA) con el anticuerpo de EGFR fosforilado.

7) Para la amplificación de las señales, se añadieron 80 µl de biotina-tiramida a una concentración de 5 µg/ml y se hicieron reaccionar durante 15 minutos. El portaobjetos se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.

8) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubaron durante 30 minutos. A continuación, se lavó el portaobjetos dos veces, se secó durante 5 minutos y se analizó en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.) .

40 Ejemplo 5. Generación de perfiles de activación para la selección de fármacos.

Los métodos de la presente invención pueden aplicarse a la selección de fármacos para el tratamiento del cáncer. Un protocolo típico incluye la generación de dos perfiles, un perfil de activación de referencia y un perfil de activación de ensayo, que seguidamente se comparan para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento farmacológico particular (ver la figura 2).

Perfil de activación de referencia:

50 Para obtener un perfil de activación de referencia, se obtuvo una muestra de sangre de un paciente que presentaba un tipo específico de cáncer (por ejemplo, un tumor pulmonar) previamente al tratamiento farmacológico anticáncer. Se aislaron células circulantes raras procedentes del tumor canceroso de la muestra de sangre utilizando, por ejemplo, técnicas de separación inmunomagnética tal como se describe en mayor detalle en la presente memoria.

55 Las células circulantes aisladas pueden estimularse *in vitro* con uno o más factores de crecimiento. A continuación, las células estimuladas se lisan para producir un extracto celular. El extracto celular se aplica en una matriz direccionable que contiene una serie de dilución de un panel de anticuerpos de captura específicos para las moléculas de transducción de señales cuyos estados de activación pueden encontrarse alterados en el tipo de cáncer del paciente. Los ensayos de detección individual o los de proximidad se llevan a cabo utilizando los anticuerpos de detección apropiados (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación) con el fin de determinar el estado de activación de cada molécula de transducción de señales de interés. La tabla de "Selección de rutas" mostrada en la Tabla 1 resulta particularmente útil para seleccionar qué estados de activación se deben detectar según el tipo de cáncer del paciente. Por ejemplo, un paciente podría presentar un tipo de cáncer que muestre los estados de activación de la

ruta de EGFR indicada en la "Ruta 1" de la Tabla 1. Alternativamente, otro paciente podría presentar otro tipo de cáncer que mostrase los estados de activación de la ruta de EGFR indicada en la "Ruta 2" de la Tabla 1. De esta manera, se genera un perfil de activación de referencia que proporciona los estados de activación de las moléculas de transducción de señales en el cáncer del paciente en ausencia de cualquier fármaco anticáncer.

5

Perfil de activación de ensayo

Con el fin de obtener un perfil de activación de ensayo, se obtiene una segunda muestra de sangre del paciente que presenta el tipo de cáncer específico (por ejemplo, un tumor pulmonar) antes del tratamiento farmacológico anticáncer o después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, en cualquier tiempo durante el curso del tratamiento del cáncer). Se aíslan a partir de la muestra de sangre células circulantes raras derivadas del tumor canceroso. En el caso de que se obtengan células aisladas de un paciente que no ha recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, las células aisladas se incuban con fármacos anticáncer con diana en una o más moléculas de transducción de señales activadas determinadas a partir del perfil de activación de referencia indicado anteriormente. La tabla de "Selección de fármaco" (Tabla A) resulta particularmente útil para seleccionar los fármacos anticáncer apropiados que se encuentran autorizados o en ensayo clínico, que inhiben moléculas diana de transducción de señales activadas específicas. Por ejemplo, en caso de que se determine a partir del perfil de activación de referencia que el EGFR se encuentra activado, las células pueden incubarse con uno o más de los fármacos listados en la columna "A" o "B" de la Tabla A. A continuación, las células aisladas pueden estimularse *in vitro* con uno o más factores de crecimiento. A continuación, las células aisladas se lisan para producir un extracto celular. El extracto celular se aplica a la matriz direccionable y se llevan a cabo ensayos de proximidad para determinar el estado de activación de cada molécula de transducción de señales de interés. De esta manera, se genera un perfil de activación de ensayo para el paciente que proporciona los estados de activación de las moléculas de transducción de señales en el cáncer del paciente en presencia de fármacos anticáncer específicos.

25

Selección de fármacos

Se determina si los fármacos anticáncer resultan adecuados o inadecuados para el tratamiento del cáncer del paciente mediante comparación del perfil de activación de ensayo con el perfil de activación de referencia. Por ejemplo, en el caso de que el tratamiento farmacológico provoque que la mayor parte o todas las moléculas de transducción de señales se encuentren sustancialmente menos activadas que en ausencia de los fármacos, por ejemplo, un cambio de una activación fuerte sin los fármacos a una activación débil o muy débil con los fármacos, se determina que el tratamiento resulta adecuado para el cáncer del paciente. En estos casos, el tratamiento se inicia con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que no ha recibido terapia farmacológica o se continúa el tratamiento con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que ya recibe el fármaco. Sin embargo, en el caso de que el tratamiento farmacológico se considere inadecuado para el tratamiento del cáncer del paciente, se seleccionan diferentes fármacos y se utilizan para generar un nuevo perfil de activación de ensayo, que seguidamente se compara con el perfil de activación de referencia. En estos casos, el tratamiento se inicia con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que no ha recibido terapia farmacológica o el tratamiento posterior se cambia a un fármaco anticáncer adecuado en un paciente que actualmente recibe el fármaco inadecuado.

40

Ejemplo 6. Matrices direccionables para el análisis de los receptores de tirosina quinasa activados.

La figura 3 ilustra una matriz direccionable ejemplar de receptor de tirosina quinasa de la invención. Tal como se comenta en la presente memoria, los receptores de tirosina quinasa son componentes cruciales de muchas rutas de transducción de señales participantes en la proliferación celular. Por ejemplo, la familia de ErbB de receptores de tirosina quinasa presenta cuatro miembros de la familia y desempeña un papel importante en procesos celulares fundamentales tales como la proliferación, diferenciación y supervivencia celulares. Se ha informado de que esta familia de receptores de tirosina quinasa se sobreexpresa en varios cánceres diferentes y se asocia a un resultado clínico peor. Al unirse el factor de crecimiento, ErbB1 o EGFR, ErbB3 o HER3 y ErbB4 o HER4 se homodimerizan y se heterodimerizan, activando varias rutas de señalización diferentes. ErbB2 o HER2 no se une a factores de crecimiento y es la pareja de heterodimerización preferente para los tres miembros de la familia. ErbB2 también puede homodimerizarse al sobreexpresarse y activar rutas de señalización. La homodimerización o heterodimerización de la familia de ErbB resulta en la trans-fosforilación. La autofosforilación o trans-fosforilación alivia la conformación inhibidora de los receptores de tirosina quinasa, permitiendo una activación de quinasa total y creando simultáneamente sitios de unión para numerosas moléculas de señalización que contienen SH2, tales como Src, Shc SHP-1, SHEP-1 y PI3K. Las proteínas adaptadoras o proteínas señalización como Shc, Grb2 ó PI3K son enviadas a los receptores fosforilados. La fosforilación de las proteínas adaptadoras resulta en la activación de las rutas de MAPK y Akt. La activación de la ruta MAPK puede evaluarse determinando el estado de fosforilación de Erk y Rsk, mientras que puede evaluarse la activación de la ruta de PI3K mediante la determinación del estado de fosforilación de Akt y p70S6K.

60

De esta manera, el chip direccionable de la familia ErbB mostrada en la figura 3 permite no sólo determinar la expresión de cuatro receptores de tirosina quinasa, sino también su estado de activación. También puede estudiarse la activación de las rutas de MAP y de PI3K/Akt en el chip direccionable. Otra característica del chip es la presencia de controles internos para determinar el contenido tumoral e IgG no específicas para determinar cualquier unión no específica.

Ejemplo 7. Matrices direccionables para el análisis de las rutas de transducción de señales en la angiogénesis

Las figura 4 ilustra la configuración de una matrices direccionable para determinar el estado de activación de los componentes de transducción de señales implicados en la angiogénesis. Tal como se indica en la presente memoria, la angiogénesis tumoral resulta crucial para el crecimiento de muchos tumores sólidos. Entre las moléculas de transducción de señales clave se incluyen los miembros de la familia de VEGFR, FGFR y TIE de receptores de tirosina quinasa, que se expresan predominantemente sobre las células endoteliales. PDGFR típicamente se expresa sobre los pericitos. El estado de expresión y activación de esos receptores resulta crítico para determinar el mecanismo predominante de angiogénesis en especímenes tumorales individuales. Algunos factores de crecimiento como VEGF y PlGF se unen a VEGFR-1 y VEGFR-2 e inician la homodimerización y la heterodimerización. Tras la dimerización se produce la fosforilación de dichos receptores, a la que sigue a su vez la activación de las rutas de señalización de MAPK y de PI3K/Akt. Los receptores FGFR, TIE y PDGFR también resultan activados de una manera similar. La autofosforilación o trans-fosforilación alivia la conformación inhibidora de los receptores de tirosina quinasa, permitiendo una activación de quinasa total y creando simultáneamente sitios de unión para numerosas moléculas de señalización que contienen SH2, tales como Src, Shc, SHP-1, V-cadherina, SHEP-1 y PI3K.

Las proteínas adaptadoras o proteínas señalización como Shc, Grb2 ó PI3K son enviadas a los receptores fosforilados. La fosforilación de las proteínas adaptadoras resulta en la activación de las rutas de MAPK y Akt. La activación de la ruta MAPK puede evaluarse determinando el estado de fosforilación de Erk y Rsk, mientras que puede evaluarse la activación de la ruta de PI3K mediante la determinación del estado de fosforilación de Akt y p70S6K.

De esta manera, los chips de angiogénesis direccionable, tales como los mostrados en la figura 4, permiten no sólo determinar la expresión de todos los componentes de transducción de señales que participan en la angiogénesis en una muestra del paciente, sino también su estado de activación. También puede estudiarse la activación de las rutas de MAP y de PI3K/Akt en el chip direccionable. El chip presenta controles internos para determinar el contenido tumoral o de células asociadas a tumor (CEC, CEP, pericitos, etc.) e IgG no específicas para determinar cualquier unión no específica.

Ejemplo 8. Selección de pacientes para el tratamiento de cáncer de células de pulmón no pequeñas.

Los tratamientos tradicionales de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) implican el uso de ambos tratamientos quimioterapéuticos y anti-angiogénicos. Como tratamientos de primera línea, los médicos emplean típicamente carboplatino (C) o carboplatino con Taxol[®] (T) y Avastin[®] para los pacientes de células no escamosas.

Los fármacos de segunda línea incluyen Taxol[®], ALIMTA[®], y Tarceva[®] (para los no fumadores, las mujeres y los asiáticos). Los ensayos clínicos en marcha están probando la eficacia de diversas combinaciones de fármacos, incluyendo: Avastin[®] + Tarceva[®] en pacientes no escamosos; sorafenib + carboplatino + Taxol[®] en todo los NSCLC incluyendo el cáncer escamoso; y ZD6474 (ZACTIMA[™]) + carboplatino + taxol[®] en todos los NSCLC incluyendo el cáncer escamoso.

Un número de alteraciones en los componentes de transducción de señales claves se han demostrado en NSCLC. Estos incluyen: mutaciones de EGFR que resultan en la activación; activación de otros receptores de tirosina quinasa tales como c-Met; La activación del EGFR con la activación de HER2 y 3 o la amplificación de HER2; la activación del EGFR con la mutación PI3K; La activación del EGFR con la delección de PTEN; y la activación de

EGFR con la mutación de Ras. Varias alteraciones en diferentes componentes de las vías de transducción de señales han sido dianas de varias formas de quimioterapia.

Al mismo tiempo, puede ser objetivo la formación de nuevos vasos sanguíneos a las células tumorales, un proceso denominado angiogénesis.

VEGF es un factor de supervivencia de las células endoteliales, que es esencial para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por consiguiente, una aproximación a la modulación de la angiogénesis mediada por VEGF es usar anticuerpos dirigidos contra la proteína VEGF o VEGFR en sí. Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante para VEGF, actúa de forma sinérgica con la quimioterapia y se ha demostrado que mejora la supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal, de mama y de pulmón.

- 5 El ejemplo que se muestra a continuación en la Tabla 3 ilustra cómo un análisis de las vías activas en las células endoteliales o las ECPs puede ser utilizado para ayudar a los médicos a decidir sobre un curso eficaz de tratamiento. En resumen, los niveles de activación de los diferentes componentes de la vía VEGF en las células endoteliales o las ECPs pueden determinarse en la presencia de ausencia de diferentes combinaciones de agentes terapéuticos de prueba.

Tabla 3

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Avastin	Activación con C+T+Avastin
VEGFR2:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
VEGFR1:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil	Débil
Complejo V-Caderin-R2	Débil	Medio	Débil	Débil
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

- 10 La información que se muestra en la Tabla 3 indica que los componentes de la transducción de señales que muestran una activación fuerte indicado por unos niveles de fosforilación fuertes son disminuidos a niveles débiles mediante el tratamiento con Avastin o C + T + Avastin. Por lo tanto, los pacientes con vías activadas VEGFR-2 y VEGFR-I deben ser tratados con Avastin o C + T + Avastin.
- 15 En la tabla 4 se muestran a continuación ejemplos de otros agentes terapéuticos que se dirigen a las vías de transducción de señales angiogénicas y que pueden ser utilizados para generar perfiles de activación de prueba.

Tabla 4

Seguridad y eficacia de los inhibidores VEGFR tirosina quinasa en NSCLC			
Inhibidor	Objetivo	Toxicidades comunes	Actividad clínica en NSCLC
Vatalanib	VEGFR-1,-2,-3, PDGFR, c-Kit, c-Fms	Fatiga, náuseas, vómitos, enzimas hepáticas elevadas, hipertensión	NO REPORTADO
AZD2171	VEGFR-1,-2,-3, PDGFR	Fatiga, diarrea, hipertensión, anorexia, disnea	SD [?]
Malato de sunitinib	VEGFR-1,-2,-3, PDGFR, c-Kit	Fatiga, erupción, despigmentación del pelo, decoloración del cabello, hipertensión	PR [?]
AG013736	VEGFR-1,-2,-3, PDGFR, c-Kit	Hipertensión, hemoptisis, estomatitis, náuseas, diarrea	Cavitación de tumor
Sorafenib	VEGFR-2,-3, PDGFR, c-Kit, Raf	Diarrea, enzimas hepáticas elevadas, hipertensión, fatiga	SD [?]
GW786034	VEGFR-1,-2,-3, PDGFR, c-Kit	Hipertensión, embolia pulmonar, náuseas, fatiga, despigmentación del pelo	SD [?]
ZD6474	VEGFR-1,-2,-3, EGFR	Diarrea, erupción, hipertensión	PR [?]
CP-547632	VEGFR-2	Erupción y sequedad en la boca	PR [?]

La tabla 4 anterior enumera las dianas para nuevos fármacos anti-angiogénicos. La presente invención permite la selección inteligente de los marcadores de activación que mejor predicen la supervivencia. Los marcadores de activación más adecuados pueden variar entre diferentes fármacos, y se pueden utilizar como una guía para seleccionar entre la monoterapia anti-angiogénica frente a la terapia de combinación.

Ejemplo 9. La selección de pacientes para el tratamiento con otros fármacos anti-angiogénicos

A continuación se presentan ejemplos adicionales de la aplicación de análisis de ruta como se describen en la presente invención para la determinación de la idoneidad de varios fármacos que fueron mostrados en la Tabla 4.

ZD6474

ZD6474 (ZACTIMA™) se encuentra actualmente en fase III de ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes para los cuales los tratamientos dirigidos a EGFR han fracasado. En concreto, este estudio se está llevando a cabo para evaluar si la adición de ZD6474 para mejorar el tratamiento de soporte (BSC) es más eficaz que la mejor atención de soporte sola, para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, cuya enfermedad ha recidivado después de la quimioterapia anterior y un inhibidor de la tirosina quinasa EGFR (TKI).

ZD6474 es un fármaco anticáncer que se dirige al crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en un tumor y por lo tanto podría ralentizar la velocidad a la que puede crecer el tumor. Estudios preliminares indican que ZD6474 tiene un efecto positivo en el momento en que un tumor puede avanzar a una nueva etapa. Para el tratamiento de tercera línea, ZD6474 se administra a pacientes que han recaído sobre la quimioterapia y EGFR TKI. La estructura de ZD6474 es diferente de Tarceva®/Iressa®, por tanto, la expectativa es que seguirá inhibiendo las vías anti-angiogénicas y EGFR (por ejemplo, VEGFR-1, -2, y -3).

En consecuencia, están en marcha los siguientes ensayos:

(a) Estudio de eficacia de comparación ZD6474 en combinación con pemetrexed y pemetrexed solo;

(b) Un ensayo comparativo de ZACTIMA™ en combinación con docetaxel y docetaxel solo en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC);

(c) Vandetanib, carboplatino y paclitaxel en el tratamiento de pacientes con estadios I, II, o III NSCLC que se puede extirpar mediante cirugía; y

(d) Ensayo de eficacia de la comparación de ZD6474 con erlotinib en NSCLC tras el fracaso de al menos una quimioterapia previa.

Como se muestra en la Tabla 5 a continuación, la selección de los pacientes que responden a combinaciones de fármacos que incluyen ZD6474 utilizando los métodos y composiciones de la presente invención, no sólo disminuiría el número de pacientes en ensayos clínicos de fase III, sino que también conduciría a una mejor atención al paciente.

Tabla 5

Células tumorales:

Receptor (Nivel de Fosforilación)	Expresión	Activación ZD 6474	Activación con Avastin	Con Activación
EGFR:	Medio	Fuerte	V. Débil	Fuerte
ErbB2:	Medio	Fuerte	V. Débil	Fuerte
ErbB3	Bajo	Medio	V. Débil	Medio
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	Débil
Shc		Fuerte	V. Débil	Fuerte
PI3K		Fuerte	V. Débil	Fuerte
Erk		Fuerte	V. Débil	Fuerte
Rsk		Fuerte	V. Débil	Fuerte
Akt		Fuerte	V. Débil	Fuerte
P70S6K		Fuerte	V. Débil	Fuerte

Tabla 6

Células endoteliales:

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con ZD 6474	Activación con Avastin
----------	---------------------------------------	------------	------------------------	------------------------

VEGFR2:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
VEGFR1:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil	Débil
Complejo V-Caderin-R2	Nulo	Medio	Débil	Débil
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

La información en las Tablas 5 y 6 indica que ZD6474 reprime las vías tanto en células endoteliales como en células tumorales.

5 AZD2171

10 Un número de ensayos clínicos con AZD2171, un agente que inhibe PDGFR y VEGFR, están en progreso. Por ejemplo, se está probando una combinación de AZD2171 y pemetrexed disódico para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas recidivante. La razón de esta combinación es que pemetrexed disódico puede detener el crecimiento de las células tumorales mediante la inhibición de las enzimas necesarias para la división celular. AZD2171 proporciona la contribución adicional de detener el crecimiento de las células tumorales mediante el bloqueo del flujo de sangre al tumor. Por lo tanto, dando AZD2171 junto con pemetrexed disódico puede tener un efecto sinérgico en matar más células tumorales.

15 Otro ensayo clínico ha emparejado el bevacizumab (Avastin®) y AZD2171 en el tratamiento de pacientes con carcinoma metastásico o tumores sólidos inresecables o linfoma. La razón de esta combinación es que los anticuerpos monoclonales, como bevacizumab, pueden bloquear el crecimiento del cáncer de varias maneras. Algunos bloquean la capacidad de las células cancerosas para crecer y extenderse. Otros encuentran células cancerosas y ayudan a matarlas o llevan a ellas sustancias que eliminan el cáncer. Bevacizumab y AZD2171 también pueden detener el crecimiento de células de cáncer mediante el bloqueo del flujo sanguíneo hacia el cáncer. Por lo tanto, la administración de bevacizumab junto con AZD2171 puede sinérgicamente destruir más células cancerosas.

25 Otros ensayos clínicos están examinando la combinación de gemcitabina y carboplatino con o sin AZD2171 como terapia de primera línea en el tratamiento de pacientes con estadio IIIB o cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio IV, y paclitaxel y carboplatino con o sin AZD2171 en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio III o IV.

30 La Tabla 7 a continuación muestra la selección de los pacientes que responden a las combinaciones de medicamentos, incluyendo AZD2171.

Tabla 7
Células endoteliales y Pericitos:

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con AZD 2171	Activación con Avastin
VEGFR2:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
VEGFR1:	Medio	Fuerte	Débil	Medio
Tie 2	Bajo	Débil	Débil	Débil
Complejo V-Caderin-R2	Nulo	Medio	Débil	Débil
PDGFRa	Medio	Alto	Débil	Alto
PDGFRb	Medio	Alto	Débil	Alto
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

35

Debido a que el PDGF se sobreexpresa en pacientes resistentes a Avastin[®], la información como la presentada en la Tabla 7 sugeriría que AZD2171, el cual inhibe a PDGFR así como VEGFR, podría ser una opción de elección para el tratamiento de este tipo de tumores.

5 Sorafenib

Un número de ensayos clínicos con sorafenib (BAY 43-9006) también están en curso. Por ejemplo, los siguientes estudios están en marcha: (1) la comparación de carboplatino y paclitaxel más o menos sorafenib en pacientes de quimioterapia simple con cáncer de pulmón de células no pequeñas; (2) ensayo controlado aleatorio que comparaba la seguridad y eficacia de carboplatino y paclitaxel, más o menos el sorafenib, en pacientes de quimioterapia simple con estadio III-IV de cáncer de pulmón de células no pequeñas; y (3) sorafenib y bevacizumab en el tratamiento de pacientes con tumores sólidos no resecables, refractarios o metastásicos.

15 En la tabla 8 se muestra a continuación, la selección de los pacientes que responden a las combinaciones de fármacos, incluyendo sorafenib.

Tabla 8
Células endoteliales y Pericitos:

Receptor	Expresión	Activación	Activación con Sorafenib	Activación con Avastin
	(Nivel de Fosforilación)			
VEGFR2:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
VEGFR1:	Medio	Débil	Débil	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil	Débil
Complejo V-Caderin-R2	Nulo	Medio	Débil	Débil
PDGFRa	Medio	Alto	Débil	Alto
PDGFRb	Medio	Alto	Débil	Alto
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

20 Debido a que en los pacientes resistentes a Avastin[®], tanto VEGF y PDGF se sobreexpresan, la combinación de Avastin[®] y sorafenib podrían ser efectivos en el cierre de ambas vías. Además, sorafenib inhibe Raf y por lo tanto puede inhibir la vía MAPK en todos los tipos de células.

25 Ejemplo 10. Otras combinaciones terapéuticas anti-angiogénicas y anti-señalizadoras

Tanto el factor de crecimiento vascular endotelial, como el receptor del factor del crecimiento epidérmico (EGFR) pueden contribuir a la angiogénesis en los tejidos tumorales y compartir las vías de señalización corriente abajo. Por lo tanto, dirigiéndose a ambas vías podría, en principio, conducir a efectos aditivos o sinérgicos antitumorales. Un estudio reciente de la Fase I/II evaluó la combinación de bevacizumab con erlotinib el inhibidor EGFR de molécula pequeña de la tirosina quinasa (TKI) en pacientes con cáncer no escamoso avanzado refractario no microcítico de pulmón (CPNM). En estudios de fase II, se ha demostrado que bevacizumab en combinación con erlotinib parecía proporcionar un beneficio independientemente del estado de la mutación EGFR tirosina quinasa (véase, por ejemplo, Herbst et al, J. Clin. Oncol, 23:2544-2555 (2005)). Por lo tanto, sin duda, silenciando tanto EGFR y VEGFR-2 parece ser beneficioso para los pacientes.

40 Entre los ensayos clínicos en curso en esta área están: (1) un estudio comparativo de la terapia con bevacizumab con o sin erlotinib para un tratamiento de primera línea de cáncer de pulmón de células no pequeñas (ATLAS); Un ensayo de placebo controlado de Fase IIIb, multicéntrico y aleatorizado, para evaluar la seguridad y eficacia de la quimioterapia + bevacizumab seguida de bevacizumab + erlotinib frente a bevacizumab + erlotinib con placebo en pacientes con NSCLC localmente avanzado o metastásico; (2) un estudio para evaluar la eficacia de bevacizumab en combinación con Tarceva[®] para el cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado; un estudio aleatorizado, doble ciego, en segunda fase III, multicéntrico, controlado con placebo.

5 Aproximadamente 650 pacientes se aleatorizaron en una proporción 1:1 a uno de los dos grupos de tratamiento: Grupo 1: Tarceva® + placebo; Grupo 2: Tarceva® + bevacizumab; (3) erlotinib y bevacizumab en el tratamiento de pacientes con estadio IIIB o estadio IV de cáncer primario de pulmón de células no pequeñas los cuales nunca habían fumado; (4) el bevacizumab y erlotinib seguido de cisplatino o carboplatino y gemcitabina en el tratamiento de los pacientes con diagnóstico reciente o recurrente de cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio IIIb o IV (5) combinación de RAD001 con carboplatino, paclitaxel y bevacizumab en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) de los pacientes no tratados previamente con terapia sistémica; (6) cetuximab, paclitaxel, carboplatino y bevacizumab en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado; (7) pazopanib + lapatanib; (8) mesilato de imatinib y bevacizumab después de la quimioterapia de primera línea y bevacizumab en el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio IIIb o IV; y (9) un ensayo de fase II de AMG706 o bevacizumab en combinación con quimioterapia para NSCLC avanzado.

15 A continuación se muestran ejemplos de la selección de pacientes para el tratamiento con diversas combinaciones de fármacos

15 Tabla 9
Células tumorales:

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Avastin + Tarceva	Activación con Avastin
EGFR:	Medio	Fuerte	V. Débil	Fuerte
ErbB2:	Medio	Fuerte	V. Débil	Fuerte
ErbB3	Bajo	Medio	V. Débil	Medio
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	Débil
Shc		Fuerte	V. Débil	Fuerte
PI3K		Fuerte	V. Débil	Fuerte
Erk		Fuerte	V. Débil	Fuerte
Rsk		Fuerte	V. Débil	Fuerte
Akt		Fuerte	V. Débil	Fuerte
P70S6K		Fuerte	V. Débil	Fuerte

20 Tabla 10
Células endoteliales:

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Avastin + Tarceva	Activación con Avastin
VEGFR2:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
VEGFR1:	Medio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil	Débil
Complejo V-Caderin-R2	Nulo	Medio	Débil	Débil
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

25 La información en las Tablas 9 y 10 indica que la combinación de Avastin® y Tarceva® reprimen las vías tanto en células endoteliales, así como células tumorales.

Tabla 11
Paciente 5001: (mutación EGFR)

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con Erbitux
EGFR:	Alto	Fuerte	V. Débil	Débil
ErbB2:	Medio	Fuerte	V. Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Medio	V. Débil	Medio
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	Débil
Shc		Fuerte	V. Débil	Débil

PI3K	Fuerte	V. Débil	Medio
Erk	Fuerte	V. Débil	Medio
Rsk	Fuerte	V. Débil	Medio
Akt	Fuerte	V. Débil	Medio
P70S6K	Fuerte	V. Débil	Medio

La información en la tabla 11, sugiere que el paciente 5001 debe ser tratado con Tarceva[®], dado que bajo la adición de este fármaco, se observó una inhibición completa de la fosforilación del receptor y de efectores "aguas abajo" (downstream effectors). Erbitux no induce el mismo nivel de inhibición. La decisión de tratar con Tarceva pudiera basarse en:

5

- (a) Rutas activadas (activación de perfil basado en chip direccionable) en células de tumor;
- (b) Rutas activadas en la estimulación; o
- (c) Inhibición de ruta con Tarceva[®].

10 Tabla 12

Paciente 5002: (mutación EGFR resistente a Tarceva[®])

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con EKB 569
EGFR:	Alto	Fuerte	Fuerte	Débil
ErbB2:	Medio	Fuerte	Fuerte	Débil
ErbB3	Bajo	Medio	Medio	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil	Débil
Shc		Fuerte	Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Fuerte	Débil

A partir de la tabla 12, este paciente sería tratado con EKB 569 basado en el perfil de inhibición.

15

Tabla 13

Paciente 5003: (Amplificación cMet, reincidido sobre Tarceva[®])

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con PHB+Tarceva
EGFR:	Alto	Fuerte	Fuerte	Débil
ErbB2:	Medio	Fuerte	Fuerte	Débil
ErbB3	Bajo	Medio	Medio	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil	Débil
cMet	Alto	Fuerte	Fuerte	Débil
Shc		Fuerte	Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Fuerte	Débil

20 El perfil de activación de ese paciente muestra una elevada expresión y fosforilación de cMet. En consecuencia, el paciente debe ser tratado con una combinación de cMet y un inhibidor de EGFR.

Tabla 14

Paciente 5004: (Activación de EGFR junto con activación Her 2 y 3. (2/3 dímero) o amplificación Her2)

25

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con Lapatanib
EGFR:	Medio	Fuerte	V. Débil	V. Débil
ErbB2:	Alto o Medio	Fuerte	Fuerte	Débil
ErbB3	Bajo	Fuerte	Fuerte	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	V. Débil
Shc		Fuerte	Fuerte	V. Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	V. Débil

Erk	Fuerte	Medio	V. Débil
Rsk	Fuerte	Medio	V. Débil
(continuación)			
Akt	Fuerte	Fuerte	V. Débil
P70S6K	Fuerte	Fuerte	V. Débil

El perfil de ruta en la tabla 14 basado en la fosforilación de Her 3 sugiere usar un inhibidor pan-Her. La potente inhibición observada con lapatanib sugiere fuertemente que ese agente debe ser la opción del tratamiento.

5 Tabla 15
Paciente 5005: (Activación de EGFR con mutación PI3K o delección PTEN)

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con Tarceva+Mek+mTor inhibidor
EGFR:	Medio	Fuerte	V. Débil	V. Débil
ErbB2:	Medio	Medio	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	V. Débil
Shc		Fuerte	Débil	V. Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	V. Débil
Erk		Fuerte	Medio	V. Débil
Rsk		Fuerte	Medio	V. Débil
Akt		Fuerte	Fuerte	V. Débil
P70S6K		Fuerte	Fuerte	V. Débil

10 Tabla 16
Paciente 5006: (Activación de EGFR con mutación Ras)

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con Tarceva+Mek+mTor inhibidor
EGFR:	Medio	Fuerte	V. Débil	V. Débil
ErbB2:	Medio	Medio	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	V. Débil
She		Fuerte	Débil	V. Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	V. Débil
Erk		Fuerte	Medio	V. Débil
Rsk		Fuerte	Medio	V. Débil
Akt		Fuerte	Fuerte	V. Débil
P70S6K		Fuerte	Fuerte	V. Débil

15 La proliferación de tipos tumorales con los tipos de perfiles mostrados en las tablas 15 y 16 están no sólo conducidos por la familia ErbB sino también por la activación de eventos aguas abajo (típicamente debido a mutantes Ras o Raf). Por consiguiente, la información del perfil indica que tales pacientes deben ser tratados con un inhibidor de EGFR junto con fármacos los cuales inhiban rutas aguas abajo, tales como las rutas MAPK y PI3K.

20 Tabla 17
Paciente 5007: (Utilizar combinación de Tarceva®+Erbix® debido a la lenta internalización (problemas de transporte))

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con Tarceva + Erbitux
EGFR:	Medio	Fuerte	Medio	V. Débil
ErbB2:	Medio	Fuerte	Medio	Débil
ErbB3	Bajo	Fuerte	Medio	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	V. Débil
Shc		Fuerte	Débil	V. Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	V. Débil
Erk		Fuerte	Medio	V. Débil
(continuación)				

Rsk	Fuerte	Medio	V. Débil
Akt	Fuerte	Fuerte	V. Débil
P70S6K	Fuerte	Fuerte	V. Débil

La información presentada en la tabla 17 anterior indica que ese paciente debe ser tratado con una combinación de Tarceva® y Erbitux®.

5 **Tabla 18**

Paciente 5008: (Selección de los pacientes que responden a la TKI y no a quimioterapia)

Receptor	Expresión (Nivel de Fosforilación)	Activación	Activación con Tarceva	Activación con Tarceva + Mek + inhibidor mTor
EGFR:	Medio	Fuerte	V. Débil	V. Débil
ErbB2:	Medio	Medio	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	V. Débil	V. Débil
Shc		Fuerte	Débil	V. Débil
PI3K		Fuerte	Fuerte	V. Débil
Erk		Fuerte	Medio	V. Débil
Rsk		Fuerte	Medio	V. Débil
Akt		Fuerte	Fuerte	V. Débil
P70S6K		Fuerte	Fuerte	V. Débil

10 La información presentada en la tabla 18 anterior indica que pacientes con mutaciones Ras, probablemente no respondan a la quimioterapia. En consecuencia, los pacientes con tales perfiles pueden ser candidatos a tratamientos con combinaciones TKI.

Ejemplo 11. Seguimiento de pacientes con cáncer de pulmón por activación de EGFR y/o HER-2 para guiar la selección del tratamiento

15 Nueve pacientes con cáncer de pulmón en tratamiento fueron evaluados por el número de CTC por el Sistema Veridex CellSearch™, y la fosforilación EGFR y HER-2 utilizando los ensayos de proximidad descritos en el presente documento. Cinco de estos pacientes también se testaron para la expresión de EGFR en CTCs por tinción con el Reactivo Fenotipificación Tumor EGFR del sistema Veridex CellSearch™. Las demografías del paciente, los antecedentes de cáncer y los medicamentos en uso se muestran en las Tablas 19, 20 y 21, respectivamente. La tabla 22 muestra el número de CTCs detectadas en cada muestra y los niveles de fosforilación relativos para EGFR y HER-2. Los niveles de fosforilación relativos fueron calculados restando los valores de los controles normales procedentes de las micromatrices. Las figuras 5 (A y B) muestran imágenes, para los pacientes seleccionados, de las tinciones de CTCs para EGFR, citoqueratina (CK) y citoqueratina con DAPI. Los controles de línea celular son SKBr3 y A431 que son positivos para la expresión de EGFR y HER-2, respectivamente.

25 El paciente 2002 tenía 2 células CTC detectadas en los 7,5 mls de sangre analizados en el Sistema^(TM) CellSearch. Ambas células resultaron positivas para la expresión de EGFR y HER-2. Este paciente estaba siendo tratado con Avastin. El tratamiento con Avastin, ya sea solo o en combinación con agentes quimioterapéuticos o el tratamiento sólo con agentes quimioterapéuticos, no habría sido una terapia adecuada para este paciente. Estos datos informan al médico que la terapia incluyendo agentes que se dirigen EGFR y HER-2 están indicados, por ejemplo, lapatinib, herceptin + Zactima, herceptin + Erbitux, Herceptin + Iressa, o Herceptin + Tarceva.

30 El paciente 2015 tenía 11 células CTC detectadas en el análisis utilizando el sistema CellSearch™. Muchas de estas células resultaron positivas para la expresión de EGFR usando el kit de Veridex. Hubo una activación significativa para EGFR y HER-2. Este paciente estaba siendo tratado con Avastin, Gemzar, y Taxotere. El tratamiento con Avastin, ya sea solo o en combinación con agentes quimioterapéuticos o el tratamiento sólo con agentes quimioterapéuticos, no habría sido una terapia adecuada para este paciente. Estos datos informan al médico que la terapia incluyendo agentes que se dirigen EGFR y HER-2, por ejemplo, lapatinib, herceptin + Zactima, herceptin + Erbitux, Herceptin + Iressa, o Herceptin + Tarceva, están indicados.

40 Los pacientes 1023, 2040, 1037, y 1035 no tenían células CTC en los 7,5 ml de sangre analizados en el Sistema™ CellSearch. También los tests resultaron negativos, como se esperaba, para la fosforilación de EGFR y HER-2 phosphorylationin utilizando los ensayos de proximidad. Las terapias actuales para estos pacientes son las siguientes: el paciente 1023 con carboplatino; paciente 2040 con Avastin; paciente 1037 con Avastin, carboplatino, paclitaxel; paciente 1035 con Avastin, carboplatino, Gemzar. Dada la falta de CTCs detectadas en la sangre de estos pacientes, se indica la continuación de las terapias actuales.

- Los pacientes 2016 y 1025 cada uno tenía 3 células CTC en los 7,5 ml de sangre analizadas en el Sistema (TM) CellSearch. En ambos casos, no hubo expresión de EGFR en todas las células, como se muestra por la tinción de EGFR Veridex. Sin embargo, ninguna de estas muestras de pacientes dieron positivo para la fosforilación EGFR o HER2. La terapia sistémica no se había iniciado aún para estos pacientes. Estos datos informan al médico de que las células tumorales de los pacientes no son conducidas por las vías EGFR/HER-2, a pesar del hecho de que no es la expresión de EGFR en las células tumorales. El tratamiento de estos pacientes con terapias específicas dirigidas contra cualquiera de EGFR o HER-2 no estaría indicado.
- 5
- 10 Paciente 1012 tenía 3 células CTC en la sangre cuando se analizaron en el sistema CellSearch™. No hubo tinción de EGFR usando el kit de Veridex. No hubo fosforilación de EGFR o HER2 indicada por el análisis de ensayo de proximidad. Este paciente estaba siendo tratado con Avastin, carboplatino y taxol. El tratamiento de este paciente con terapias específicas dirigidas contra cualquiera de EGFR o HER-2 no estaría indicado.
- 15 La tabla 22 muestra un resumen de la información de diagnóstico para cada paciente y las recomendaciones para el tratamiento en base a los datos de número de CTC y fosforilación de EGFR y HER2.

Tabla19. Demografías de los 9 pacientes con cáncer de pulmón

Número de paciente	Fecha de cumpleaños	Género	Raza/Etnia
02-002	19-Abl-45	Masculino	Caucásico
01-012	20-Jun-43	Masculino	Caucásico
02-015	9-Dic-50	Masculino	Caucásico
02-016	5-Mar-38	Femenino	Caucásico
01-025	4-Dec-42	Masculino	Hispano/Latino
01-023	2-Dec-51	Masculino	Hispano/Latino
01-040	16-Sep-63	Masculino	Asia
01-037	5-Abr-55	Masculino	Asia
01-035	15-Sep-47	Masculino	Asia

20

Tabla 20. Historia del cáncer de los 9 pacientes de cáncer de pulmón

Número de Paciente	Tipo de Cáncer	Estado	Sitio de ubicación	Fecha de diagnóstico	Tipo de Tratamiento
02-002	PULMÓN	4	ADRENAL	01/JUL/2005	QUIMIO
01-012	PULMÓN	4	CEREBRO	09/OCT/2007	RADIACIÓN QUIMIOTERAPIA
02-015	PULMÓN	4	HUESO, CEREBRO	24/OCT/2007	QUIMIO
02-016	PULMÓN	4	HÍGADO	18/AGO/2007	QUIMIO
01-025	PULMÓN	4	HÍGADO	18/ABR/2007	QUIMIOTERAPIA
01-023	PULMÓN	4	NÓDULOS LIMFÁTICOS, HUESOS	29/AGO/2007	QUIMIOTERAPIA
02-040	PULMÓN	4	HUESOS, ADRENAL, CEREBELO	06/DIC/2006	QUIMIO RADIACIÓN
01-037	PULMÓN	4	LÓBULO HEPÁTICO DERECHO INFERIOR	25/OCT/2007	QUIMIOTERAPIA
01-035	PULMÓN	4	OTRO PULMÓN	22/DEC/2006	QUIMIOTERAPIA

25 Tabla 21. Medicaciones actuales de los 9 pacientes de cáncer de pulmón

Número de Paciente	Nombre del fármaco	Diagnóstico asociado con el tratamiento	Dosis
02-002	AVASTIN	CÁNCER	1400 MG QD
(continuación)			
01-012	AVASTIN	QUIMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	1000 MG Q 2 SEMANA

ES 2 526 211 T3

01-012	BENADRYL	PRE-QUIMIO	25 MG Q 2 SEMANAS
01-012	BENAZEPRIL	HIPERTENSIÓN	20 MG UNO Q D
01-012	BNAZEPRIL HCL	HIPERTENSIÓN	10 MG UNA VEZ Q D
01-012	CARBOPLATIN	QUÍMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	775 MG Q 2 SEMANAS
01-012	DECADRON	PRE-QUIMIO	20 MG Q 2 SEMANAS
01-012	DEXAMETHASONE	PRE-MED PARA QUIMIO DE CÁNCER	4 MG UNO TID
01-012	TAGAMET	PRE-QUIMIO	300 MG Q 2 SEMANAS
01-012	TAXOL	QUIMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	315 MG Q 2 SEMANAS
01-012	ZOFRAN	PRE-QUIMIO	32 MG Q 2 SEMANAS
01-012	ZOLPIDEM	SOMNÍFERO	10 MG UNO Q D
02-015	ACTOS	DIABETES MELLITUS TIPO 2	30 MG QD
01-015	VASTIN	CA DE PULMÓN	1400 MG Q 28 D
01-015	BENADRYL	ERUPCIONES	25 MG Q 28 D
01-015	COMPAZINE	NÁUSEA	10 MG Q 6-8 HR P
01-015	DECADRON	NÁUSEA	32 MG CADA 3 HR
01-015	DECADRON	NÁUSEA	20 MG Q 28 D
01-015	DILANTIN	ATAQUES	800 MG CADA 3 H
01-015	DIOVAN	HIPERTENSIÓN	120 MG BID
01-015	ENALAPRIL	HIPERTENSIÓN	80 MG 4XD
01-015	FLOMAX	HIPERPLASIA PROSTÁTICA	8 MG BID
01-015	GEMZAR	CA PULMÓN	2200 MG Q 28 D
01-015	LIPITOR	HIPERCOLESTEROLEMIA	20 MG BID
01-015	MAG-OX	SUPLEMENTO DE SALUD	BID 800 MG
01-015	MORPHINE	DOLOR DE CÁNCER	Q 12 HR 15 MG
01-015	NEURONTIN	NEUROPATÍA	2400 MG TID
01-015	TAGAMET	GERD	300 MG Q 28 D
01-015	TAXOTERE	CA PULMÓN	130 MG Q 28 D
01-015	VICODIN E.S	DOLOR	750 MG Q 4 HR PR
01-015	XANAX	ANSIEDAD	BID 1 MG PRN
01-015	ZOFRAN	NÁUSEA	32 MG Q 28 D
01-015	ZOFRAN	NÁUSEA	8 MG Q HR HR
01-015	ZOMETA	CA PULMÓN	4 MG Q 28 D
01-016	ADVAIR DISKUS	EMFISEMA	500 MG QD
01-016	FLONASE	ALERGIAS TEMPORALES	100 MCG BID
01-016	LASIX	HIPERTENSIÓN	40 MG QD
01-016	LEVAQUIN	BRONQUITIS	500 MG QD
01-016	LEVOXYL	HIPOTIROIDISMO	0,15 MG QD
01-016	LIPITOR	HIPERCOLESTEROLEMIA	20 MG QD
01-016	LISINOPHIL	HIPERTENSIÓN	10 MG QD
01-016	LORAZEPAM	INSOMNIO	3 MG TID
01-016	NITRO STAT	ANGINA	0,4 MG PRN
01-016	NITROGLYCERIN	ANGINA	5 MG BID
01-016	PROCRIT	ANEMIA	40.000 UNIDADES 5Q
01-016	VICODIN	DOLOR DE CÁNCER	10-325MGQ-
01-016	ZANTAC	GERD	300 MG BID
(continuación)			
01-025	ALLOPURINOL	GERD	300 MG UNO QD
01-025	BIAXIN	PROFILAXIS	500 MG UNO PRN
01-025	HYDROCHLOROTHIAZIDE	HIPERTENSIÓN	50 MG UNO QD
01-025	IBUPROFEN	DOLOR	800 MG UNO PRN
01-025	LEVOTHYROXINE	HIPOTIROIDISMO	0,175 MG UNO QD
01-025	LISINOPRIL	HIPERTENSIÓN	40 MG UNO QD
01-025	LOVASTATIN	HIPERCOLESTEROLEMIA	40 MG UNO QD
01-025	PAXIL	DEPRESIÓN	20 MG UNO QD
01-025	PROTONIX	GERD	40 MG UNO QD
01-025	SPIRIVA	COPD	18 MCG UNO QHS

ES 2 526 211 T3

01-025	VERAPAMIL	HIPERTENSIÓN	240 MG UNO BID
01-023	BENADRYL	MED PRE-QUIMIO	50 MG Q 3 SEMANAS
01-023	CARBOPLATIN	QUIMIOTERAPIA	500 MG Q 3 SEMANAS
01-023	DECADRON	MED PRE-QUIMIO	20 MG Q 3 SEMANAS
01-023	KYTRIL	MED PRE-QUIMIO	1 MG Q 3 SEMANAS
01-023	NORMAL SALINE	HIDRATACIÓN	250 MG PRN
01-023	TAGAMET	MED PRE-QUIMIO	300 MG Q 3 EMANAS
02-040	AVASTIN	CÁNCER DE PULMÓN	700 MG Q 3 WKS
02-040	DULCOLOX	CONSTIPACIÓN	10 MG 1 TAB QD
02-040	PEPCID	GERD	10 MG PRN
02-040	QUINAPRIL	HIPERTENSIÓN	10 MG QD
02-040	ZOMETA	CÁNCER DE PULMÓN	4 MG Q 3 WKS
01-037	AVASTIN	QUIMIOTERAPIA PARA CÁNCER DE PULMÓN	1200 MG Q 21 DIA
01-037	BENADRYL	PRE-QUIMIOTERAPIA	50 MG Q 21-DIA
01-037	BIOPROLOL	HIPERTENSIÓN	5 MG UNO QD
01-037	CARBOPLATIN	QUIMIOTERAPIA PARA CÁNCER DE PULMÓN	700 MG Q 21-DA
01-037	DECADRON	PRE-QUIMIOTERAPIA	20 MG Q 21-DIAS
01-037	FLUCONAZOLE	HONGOS	200 MG DOS QD
01-037	GLYBURIDE	DIABETES	2,5 MG UNO QD
01-037	PROTONIX	REFLUJO DE ÁCIDO	40 MG UNO QD
01-037	TAGAMET	PRE-QUIMIOTERAPIA	300 MG Q 2-DA
01-037	TAXOL	QUIMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	340 MG Q 21-DA
01-037	ZOFRAN	PRE-QUIMIOTERAPIA	32 MG Q 21-DIA
01-035	AVASTIN	QUIMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	MG Q 21 DA
01-035	CARBOPLATIN	QUIMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	700 MG Q 21 DIA
01-035	DECADRON		20 MG Q 21 DIA
01-035	GEMZAR	QUIMIO PARA CÁNCER DE PULMÓN	1.800 MG Q 21 DA
01-035	MEGACE	INCREMENTO DEL APETITO	20 ML QD
01-035	ZOFRAN	PRE-MED PARA QUIMIO	32 MG Q 21-DIA

Tabla 22. Número de células CTC (por 7,5 ml), tinción EGFR Veridex, y niveles de fosforilación de EGFR y HER2 relativos para 9 muestras de cáncer de pulmón. La guía de terapéutica se obtiene de los datos.

ID del Paciente	Número CTCs	Tinción EGFR Veridex	pEGFR Relativo	pHER2 Relativo	Guía de terapia
2002	2	+	1,62	1,89	Inhibidores EGFR/HER2 recomendados
1012	3	-	0,83	0,8	Inhibidores EGFR/HER2 no indicados
2015	11	+	1,74	1,72	Inhibidores EGFR/HER2 recomendados
2016	3	+	0,61	0,65	Inhibidores EGFR/HER2 no indicados
1025	3	+	0,94	0,69	Inhibidores

ES 2 526 211 T3

					EGFR/HER2 no indicados
1023	0	nd	0,66	0,72	Inhibidores EGFR/HER2 no indicados
2040	0	nd	1,0	1,0	Inhibidores EGFR/HER2 no indicados
1037	0	nd	0,93	0,64	Inhibidores EGFR/HER2 no indicados
1035	0	nd	0,01	0,05	Inhibidores EGFR/HER2 no indicados

REIVINDICACIONES

1. Un método para la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor de pulmón, que comprende:
- 5 (a) aislar las células del tumor de pulmón después de la administración de un medicamento contra el cáncer, o antes de la incubación con el fármaco contra el cáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- 10 (c) detectar un estado de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para una pluralidad de moléculas de transducción de señales, en el que los anticuerpos de captura están inmovilizados sobre un soporte sólido; y donde la pluralidad de moléculas de transducción de señales comprenden Her₃(ErB₃); y
- 15 (d) determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del tumor de pulmón mediante la comparación del estado de activación detectada por una pluralidad de moléculas de transducción de señales con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco contra el cáncer.
2. Un método para la identificar la respuesta a un tratamiento de tumor de pulmón con un fármaco anticáncer, el método comprende:
- 20 (a) aislar las células del tumor de pulmón después de la administración de un medicamento contra el cáncer, o antes de la incubación con el fármaco contra el cáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- 25 (c) detectar un estado de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para una pluralidad de moléculas de transducción de señales, en el que los anticuerpos de captura están inmovilizados sobre un soporte sólido; y donde la pluralidad de moléculas de transducción de señales comprenden Her₃(ErB₃); y
- 30 (d) identificar si un tumor de pulmón responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del estado de activación detectado por una pluralidad de moléculas de transducción de señales con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco contra el cáncer.
3. Un método para predecir la respuesta de un paciente que tiene un tumor de pulmón al tratamiento con un fármaco anticáncer, el método comprende:
- 35 (a) aislar las células del tumor de pulmón después de la administración de un medicamento contra el cáncer, o antes de la incubación con el fármaco contra el cáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- 40 (c) detectar un estado de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para una pluralidad de moléculas de transducción de señales, en el que los anticuerpos de captura están inmovilizados sobre un soporte sólido; y donde la pluralidad de moléculas de transducción de señales comprenden Her₃(ErB₃); y
- 45 (d) Predecir la probabilidad de que el paciente responda al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del estado de activación detectado por una pluralidad de moléculas de transducción de señales con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco contra el cáncer.
4. El método de acuerdo a las reivindicaciones 1, 2 ó 3, donde el tumor de pulmón se deriva de un sujeto con un cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).
5. El método de la reivindicación 4, en el que el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes, carcinoma broncoalveolar (BAC), y carcinoma de células de avena.
- 50 6. El método de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en el que las células comprenden células circulantes del tumor de pulmón.
- 55 7. El método de la reivindicación 6, en el que las células circulantes son de un grupo que consiste en células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales circulantes, células madre cancerosas, células tumorales diseminadas y las combinaciones de las mismas.
- 60 8. El método de la reivindicación 6 ó 7, en el que las células son aisladas de una muestra mediante separación inmunomagnética i la muestra se selecciona de un grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, esputo, líquido de lavado bronquial, orina, aspirado de pezón, limfa, saliva, aspirado de aguja fina y las combinaciones de los mismos.

9. El método de las reivindicaciones 1,2 ó 3, en el que las células son aisladas a partir de tejido tumoral.
10. El método de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en el que el fármaco anticáncer comprende un agente que interfiere con la función de activación de los componentes de la ruta de transducción de señales en células cancerígenas.
- 5 11. El método de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en el que el paso (c) del ensayo comprende:
- (i) Incubar el extracto celular con una pluralidad de diluciones seriadas de captura de anticuerpos para formar una pluralidad de analitos capturados.
- 10 (ii) Incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos específicos dependientes del estado de activación para los correspondientes analitos con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables.
- (iii) Incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y segundo miembro de un par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
- 15 (iv) Detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de un par de amplificación de señales.
12. El método de las reivindicaciones 1, 2 ó 3 en el que el paso (c) del ensayo comprende:
- (i) Incubar el extracto celular con una pluralidad de diluciones seriadas de captura de anticuerpos para formar una pluralidad de analitos capturados.
- 20 (ii) Incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación y una pluralidad de anticuerpos específicos dependientes del estado de activación para los correspondientes analitos con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables, donde los anticuerpos independientes del estado de activación están etiquetados con una fracción facilitadora, los anticuerpos dependientes del estado de activación están etiquetados con un primer miembro de un par de amplificación de señal, y la fracción facilitadora genera un agente oxidante el cual canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;
- 25 (iii) Incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señal para generar una señal amplificada; y
- 30 (iv) Detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de el par de amplificación de señales.
13. Usar una matriz que comprende una pluralidad de diluciones seriadas de anticuerpos de captura unidos a un soporte sólido, donde los anticuerpos de captura en cada dilución seriada son específicos para uno o más analitos correspondientes a una ruta de transducción de señal en un extracto celular, y donde los anticuerpos de captura comprenden anticuerpos reactivos con Her₃ (ErbB₃), para la selección de un fármaco anticáncer apropiado para el tratamiento de un tumor de pulmón, de acuerdo a el método de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3.
- 35 14. El uso de la reivindicación 13, donde la ruta de transducción de señal está involucrada en la proliferación celular o la angiogénesis tumoral.
- 40 15. El uso de la reivindicación 13, donde el extracto celular comprende un extracto de células circulantes de un tumor sólido

Rutas de familia ErbB

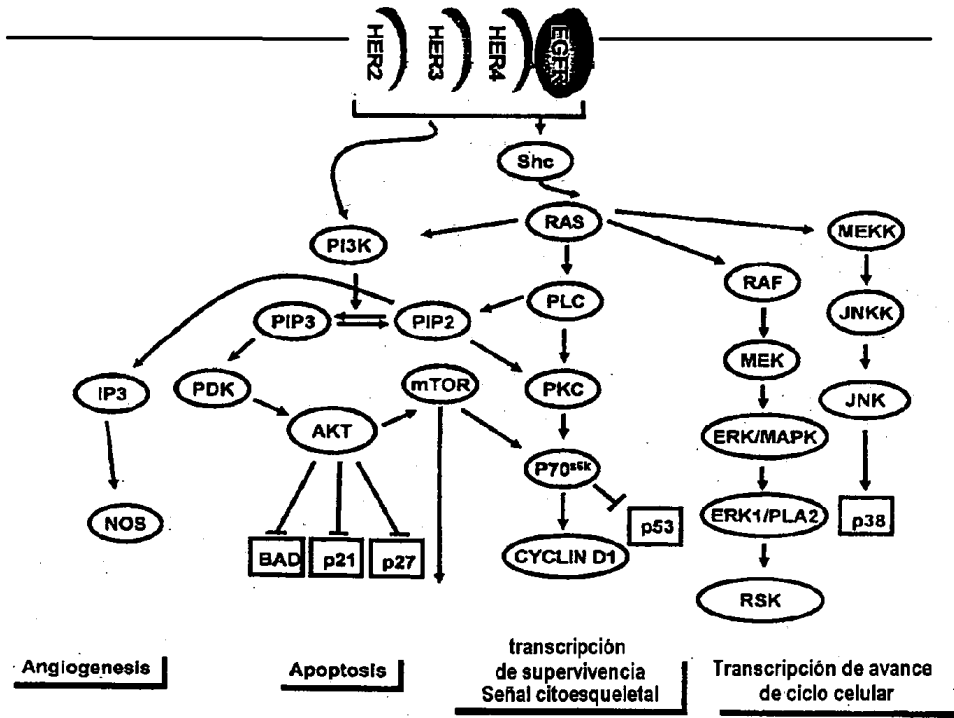


Figura 1

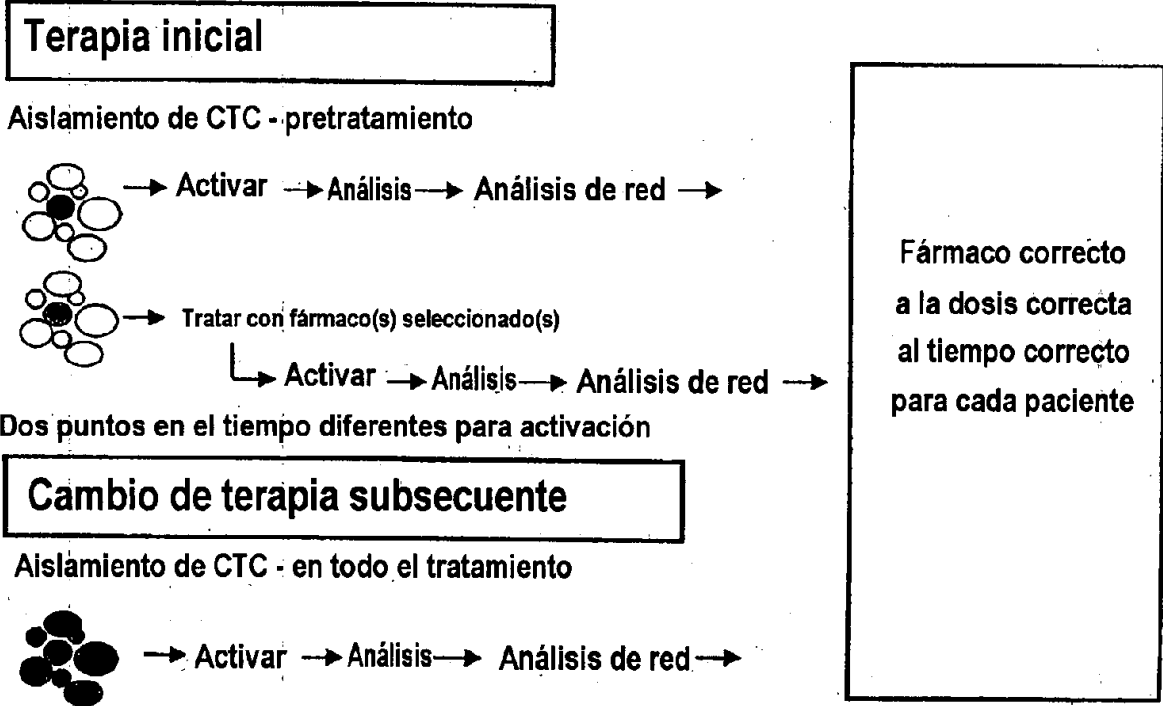


Figura 2

HTS -
Matriz de ruta de RTK (16x16)

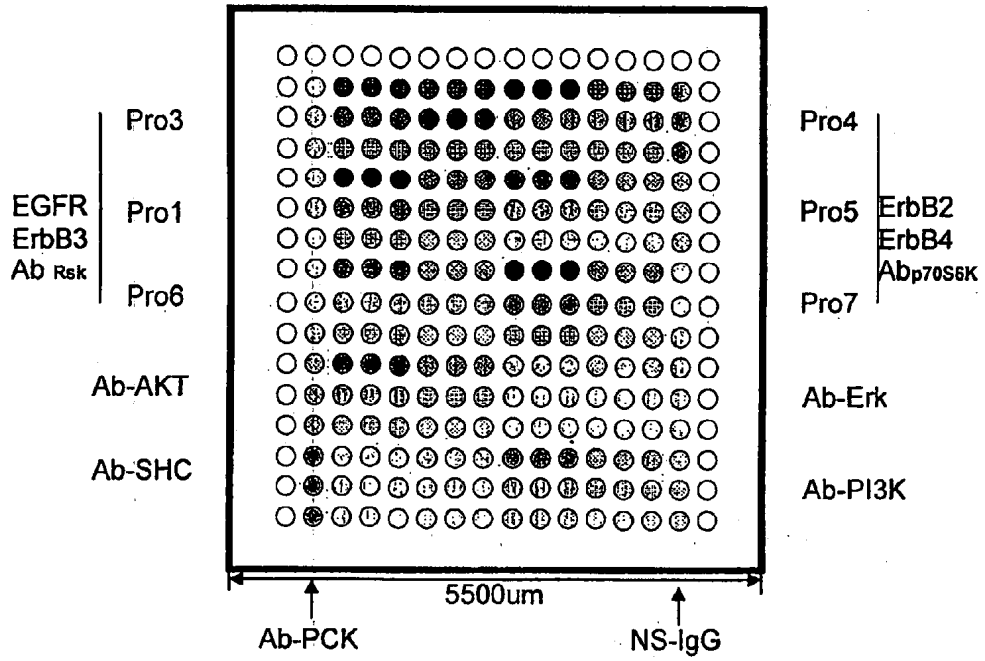


Figura 3

Chip de angiogénesis.

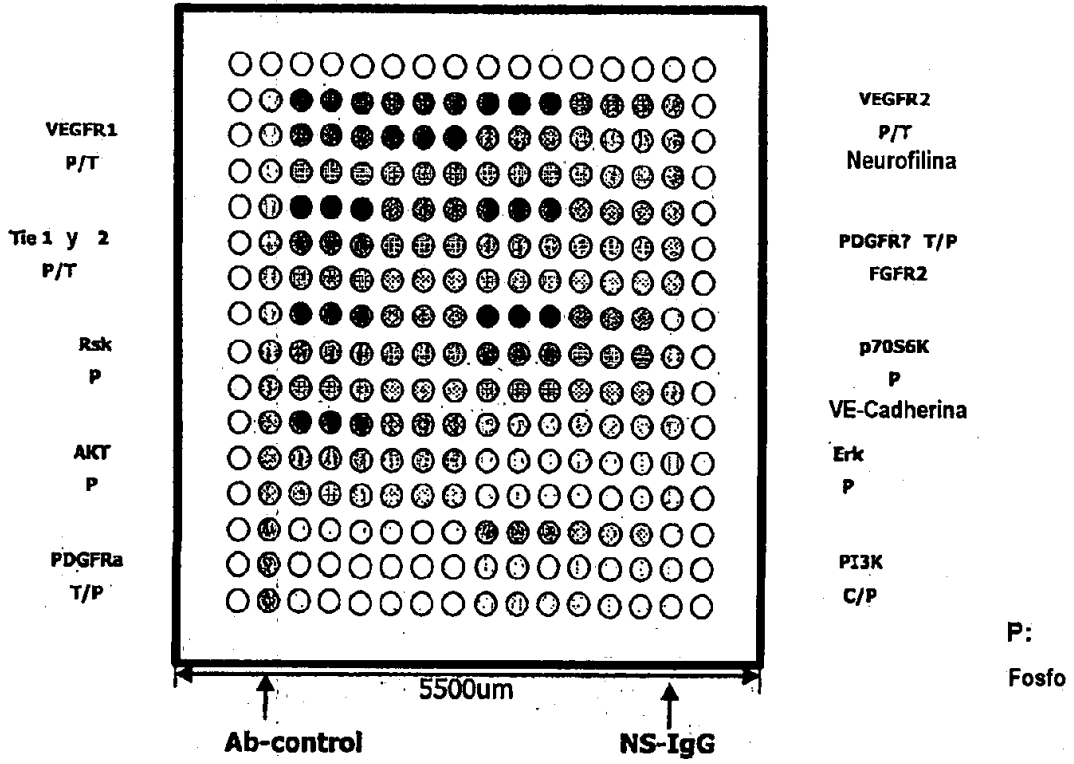
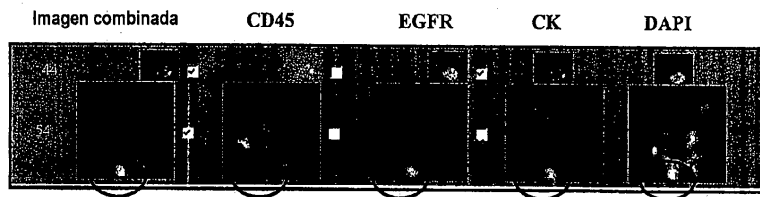


Figura 4

A. Paciente 2002 con 2 CTC



B. Paciente 2015 con 11 CTC

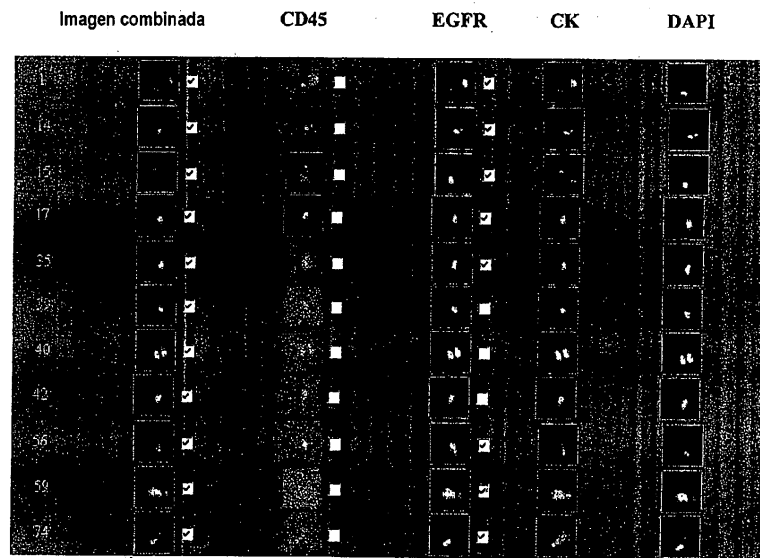


Figura 5