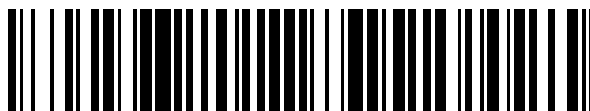


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 390**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2009** **E 12183659 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2602623**

54 Título: **Método para la detección de receptores truncados intracelulares**

30 Prioridad:

25.02.2008 US 31319 P
17.10.2008 US 106404 P
24.10.2008 US 108384 P
25.11.2008 US 117908 P
23.12.2008 US 140558 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.12.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 553 390 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

Método para la detección de receptores truncados intracelulares

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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.

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 (FCE) de estimulación de la proliferación celular en las células (ver la figura 1). El FCE se une a una tirosina quinasa unida a receptor transmembranal, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (RFCE), que resulta activado por la unión del FCE. La unión de FCE al RFCE activa la actividad de tirosina quinasa del dominio citoplasmático del receptor. Una consecuencia de esta activación de quinasa es la autofosforilación del RFCE en los residuos de tirosina. Los residuos de tirosina fosforilada en el RFCE 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 RFCE-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.

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 FCE llevando a una transcripción alterada de genes que resultan importantes para la progresión del ciclo celular.

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 RFCE 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 RFCE, incluyendo el gefitinib y el erlotinib para el cáncer de pulmón, y el cetuximab para el cáncer de colon.

El cetuximab es un ejemplo de un inhibidor de anticuerpos monoclonales, el cual se une al dominio del RFCE de unión a ligandos extracelulares, impidiendo de esta manera la unión de ligandos que activan la RFCE tirosina quinasa. En contraste, el gefitinib y el erlotinib son moléculas pequeñas que inhiben la RFCE tirosina quinasa de localización intracelular. En ausencia de actividad de quinasa, el RFCE 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 tumorales.

Además, otros estudios han demostrado que aproximadamente el 70% de los melanomas humanos y una fracción más pequeña 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. Kelkar *et al.*, Journal of Virology 78(18):10122-10132, 2004, se refiere al estudio de la interacción de los adenovirus con la dineína y microtúbulos citoplasmáticos. El documento nº US 2007/111944 se refiere a un método para purificar una molécula de factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV) mediante cromatografía de afinidad de una muestra biológica que contiene la molécula que debe purificarse, bajo condiciones suficientes para la unión de las moléculas de longitud completa pero no de

las formas truncadas o recortadas. Scaltriti *et al.*, National cancer institute Journal, Oxford University; Vol. 99(8):628-638, 2007, se refiere a la detección de p95HER2, una forma truncada del receptor de ErbB2 (HER-2) y la respuesta a las terapias anti-HER2 en el cáncer de mama.

Dado que diferentes tratamiento 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 celulares, 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.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para detectar los estados de activación de los componentes de las rutas de transducción de señales en las células tumorales (por ejemplo células circulantes de un tumor mamario). 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.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de un receptor truncado p95ErbB2, utilizando una matriz, comprendiendo dicho método:

- (a) incubar un extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (DEC) de un receptor de ErbB2 (HER-2) de longitud completa e incubar dicho extracto celular con una pluralidad de anticuerpos de captura, en el que dicha pluralidad de anticuerpos de captura es específica para una región de unión a dominio intracelular (DIC) de dicho receptor truncado y en el que dicha pluralidad de anticuerpos de captura está inmovilizada sobre un soporte sólido en la matriz formando una pluralidad de receptores truncados capturados,
- (b) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección específicos para los receptores truncados correspondientes formando una pluralidad de receptores truncados capturados detectables,
- (c) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un primer y segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
- (d) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para ayudar o asistir en la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una matriz que presenta un rango dinámico superior que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido, en el 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 u otra proteína (por ejemplo un receptor de hormona nuclear) en un extracto celular. Las matrices direccionables descritas en la presente memoria resultan particularmente útiles para determinar la expresión y/o estado de activación de moléculas de transducción de señales y otras proteínas implicadas en el cáncer de mama.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de la descripción detallada y figuras siguientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La figura 2 muestra una realización de la presente invención en la que los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria detectaron RFCE fosforilado (pRFCE) y HER-2 fosforilado (pHER-2) con sensibilidad de células individuales.

La figura 3 muestra que los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria resultaron en ensayos altamente específicos para la detección de HER-2 al nivel de células individuales únicamente en células que expresaban HER-2.

5 La figura 4 muestra esquemáticamente la aplicación de las matrices direccionables de la invención para la selección de fármacos durante el curso del tratamiento del cáncer.

La figura 5 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 RFCE/MAPK/ERK. Los anticuerpos se han sembrado por triplicado a cuatro diluciones diferentes en la matriz direccionable.

La figura 6 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. Los anticuerpos se han sembrado por triplicado a cuatro diluciones diferentes en la matriz direccionable.

La figura 7 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. Los anticuerpos se han sembrado por triplicado a cuatro diluciones diferentes en la matriz direccionable.

La figura 8 muestra un ejemplo esquemático de una matriz direccionable que comprende diluciones de anticuerpos contra componentes de una ruta de receptor de tirosina quinasa y rutas de transducción de señales activadas en la angiogénesis tumoral. Los anticuerpos se han sembrado por triplicado a cuatro diluciones diferentes en la matriz direccionable.

La figura 9 muestra un ejemplo esquemático de una matriz direccionable que comprende diluciones de anticuerpos contra componentes de una ruta de receptor de tirosina quinasa y rutas de transducción de señales activadas en la angiogénesis tumoral. Los anticuerpos pueden sembrarse por triplicado en una serie de dilución en la matriz direccionable.

La figura 10 muestra los niveles relativos de fosforilación de RFCE para 5 muestras de cáncer de mama y 6 muestras normales. Los datos también se muestran en la Tabla 40.

La figura 11 muestra los niveles relativos de fosforilación de HER-2 para 5 muestras de cáncer de mama y 6 muestras normales. Los datos también se muestran en la Tabla 41.

La figura 12 muestra imágenes de tinción CTC en el sistema Veridex Cell SearchTM para 5 pacientes de cáncer de mama. Las líneas celulares de control eran la A431 (positiva para RFCE) y SKBr3 (positiva para HER-2).

La figura 13 muestra que la HER-2 de longitud completa (ErbB2) puede extraerse de una muestra del paciente utilizando anticuerpos que se unen al dominio extracelular de Erb2 unido a una perla de poliestireno o a un dextrano polimérico.

La figura 14 muestra una realización de la presente invención para detectar receptores truncados tales como p95ErbB2. SA = estreptavidina; HRP = peroxidasa de rábano picante; TSA = amplificación de señales con tiramida.

La figura 15 muestra que el pretratamiento con perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular (DEC) de ErbB2 (HER-2) eliminó prácticamente por completo la señal de ErbB2 de longitud completa sin afectar a la señal de dominio intracelular (ICD) de ErbB2.

La figura 16 muestra que el tratamiento con APMA (acetato (4-aminofenil)mercúrico) incrementó la fosforilación de p95ErbB2 en células BT-474.

La figura 17 muestra que la heregulina incrementó la fosforilación de p95ErbB2 en células T47D.

La figura 18 muestra múltiples puntos en los que pueden utilizarse los métodos de la presente invención para influir sobre la práctica clínica con respecto a la selección de la terapia para el cáncer de mama apropiada para un paciente particular.

La figura 19 muestra una realización del formato de ensayo de la presente invención, el cual se basa en la colocalización de dos anticuerpos detectores adicionales unidos a enzimas para los sucesos de canalización posteriores para cada proteína diana unida.

La figura 20 muestra la sensibilidad para células individuales de los ensayos de pHER-1 y de pHER-2.

La figura 21 muestra la expresión/activación de ErbB con el tratamiento de FCE o de HRG β en diversas líneas celulares.

5 La figura 22 muestra el perfil de Erb RTK de las células T47D con estimulación con FCE o HRG β .

La figura 23 muestra una realización ejemplar de una matriz de la ruta de ErbB.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 I. Introducción

Tal como se ha indicado 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

25 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 y composiciones para la detección de la expresión y estados de activación de una pluralidad de moléculas de transducción de señales desregulada 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 y composiciones 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.

35 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 biopsia, 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 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.

50 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 RFCE 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.

60 Entre las células circulantes raras se incluyen las células circulantes de un tumor sólido que han metastizado o micrometastizado 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 horas, y más preferentemente dentro de los primeros aproximadamente 30, 15 ó 5 minutos. Las células aisladas también pueden incubarse ventajosamente con uno o más factores de crecimiento, habitualmente a concentraciones entre nanomolares y micromolares, durante aproximadamente 1 a 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 y 5 minutos) o durante varias horas (por ejemplo durante aproximadamente 1 a 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 al proporcionarle el fármaco anticáncer correcto a la dosis correcta en el momento correcto para cada paciente.

Con respecto al cáncer de mama, las opciones de ensayo actuales resultan insatisfactorias porque el tratamiento de los tumores tanto primarios como metastásicos en un paciente de cáncer de mama se basa en un diagnóstico puntual a partir de una muestra de biopsia obtenida durante un estadio temprano de la enfermedad. En particular, la intervención terapéutica para los estadios tanto tempranos como metastásicos del cáncer de mama se basa únicamente en el diagnóstico inicial derivado de la muestra de biopsia obtenida durante un estadio temprano de la enfermedad debido a la imposibilidad práctica de obtener una muestra de biopsia de un paciente con cáncer metastásico. Sin embargo, los tumores de mama se desarrollan en función del tiempo y el tratamiento, de manera que el seguimiento temporal de los tumores de mama resulta crucial para un control óptimo de los pacientes de cáncer de mama. Por ejemplo, un cambio en el estado de activación de uno o más de los receptores de tirosina quinasa de la familia de ERbB (HER) podría afectar a la selección de terapia en el momento de una recurrencia. En efecto, la discrepancia en el estatus de HER-2 entre el cáncer primario y el cáncer metastásico es común debido a que 37% de todos los pacientes de cáncer de mama cambian de un tumor primario negativo para HER-2 a cáncer metastásico positivo para HER-2. Además, los pacientes pueden presentar resistencia de nuevo o desarrollar resistencia adquirida a la terapia hormonal debido a la activación de HER-1/2. En algunos casos, los pacientes pueden presentar resistencia *de novo* o desarrollar resistencia adquirida a terapias dirigidas contra ErbB debido a la presencia de células tumorales que expresan p95HER-2. En consecuencia, existe una necesidad clínica no satisfecha de ensayos que ayuden al médico clínico en la prescripción de la terapia apropiada para el cáncer en el tiempo correcto debido a que la tecnología actual no presenta suficiente sensibilidad y especificidad, no puede utilizarse para el seguimiento de pacientes bajo terapia y no utiliza el perfilado de rutas para guiar las decisiones individualizadas de tratamiento.

En contraste con las opciones de ensayo del cáncer de mama disponibles actualmente, los métodos de la presente invención permiten el seguimiento de los pacientes de cáncer de mama durante todos los estadios de la enfermedad, al proporcionar una "biopsia en tiempo real" de los tumores de mama sólidos utilizando muestras tales como células tumorales circulantes (CTC) procedentes de la sangre y/o de aspirados con aguja fina (AAF). A título de ejemplo no limitativo, los ensayos de cáncer de mama descritos en la presente memoria pueden utilizarse en el diagnóstico inicial del cáncer de mama en un paciente en un estadio temprano de la enfermedad. La selección de una terapia adecuada para el cáncer está guiada por el perfilado de los estados de activación de rutas de señalización específicas con y sin fármacos anticáncer utilizando los ensayos de detección única y de doble detección por proximidad descritos en la presente memoria. Ventajosamente, los métodos de la presente invención pueden utilizarse además para el seguimiento de la progresión o regresión de la enfermedad debido a que la intervención terapéutica puede basarse en muestras obtenidas en cualquier estadio de la enfermedad y analizarse utilizando los ensayos de detección única y de doble detección por proximidad descritos en la presente memoria. De esta manera, la selección de terapias del cáncer adecuadas para los estadios tempranos y metastásicos del cáncer de mama está guiada por el diagnóstico en tiempo real y un análisis del estado de activación de moléculas específicas de rutas de señalización.

Los métodos de la presente invención se adaptan ventajosamente para resolver cuestiones cruciales en el control del cáncer y para proporcionar un mejor estándar de cuidado para los pacientes de cáncer de mama, debido a que (1) proporcionan una sensibilidad incrementada (por ejemplo puede conseguirse la detección de células individuales para detectar moléculas de transducción de señales totales y fosforiladas, tales como RFCE y HER-2), (2) proporcionan una especificidad incrementada (por ejemplo los ensayos de proximidad de tres anticuerpos incrementan la especificidad para detectar moléculas fosforiladas de transducción de señales), (3) permiten el perfilado de rutas (por ejemplo, puede detectarse el estado de activación de moléculas específicas de transducción

de señales en CTC o AAF de pacientes), y (4) elimina posibles problemas durante la obtención de las muestras de los pacientes (por ejemplo, los ensayos pueden llevarse a cabo en unas cuantas células tumorales). Aunque puede utilizarse cualquier muestra en los nuevos ensayos descritos en la presente memoria, las CTC resultan particularmente útiles porque representan las células tumorales más agresivas, es conocido que todos los tumores liberan las CTC, pueden ser la única fuente de tumores residuales o tumores metastásicos de difícil acceso, y se encuentran en la sangre. De esta manera, los métodos de la presente invención permiten el muestreo en serie de tejidos de tumor mamario, resultando en la obtención de información valiosa sobre los cambios producidos en las células tumorales como función del tiempo y la terapia, y proporcionan al médico clínico medios para realizar un seguimiento de las firmas de rutas de señalización de cáncer en rápido cambio.

En resumen, los métodos de la presente invención proporcionan ventajosamente una selección y seguimiento precisos de los pacientes de cáncer (por ejemplo pacientes de cáncer de mama) que más probablemente se beneficiarían de la terapia dirigida, llevando a cabo el perfilado de rutas con células tumorales de fácil acceso utilizando ensayos múltiplex de anticuerpos de detección única o de proximidad.

II. Definiciones

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos y expresiones siguientes presentan los significados atribuidos a ellos 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 cáncer anal, el cáncer de los conductos biliares, el cáncer del intestino delgado y el cáncer de estómago (gástrico), el cáncer esofágico, el cáncer de la vesícula biliar, el cáncer hepático, el cáncer pancreático, el cáncer del apéndice, el cáncer ovárico, el cáncer renal (por ejemplo el carcinoma de células renales), el cáncer del sistema nervioso central, el cáncer de piel, los linfomas, los coriocarcinomas, los cánceres de cabeza y cuello, los sarcomas osteogénicos y las leucemias. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "tumor" comprende una o más células cancerosas. En una realización preferente, el tumor mamario se deriva de un sujeto con una forma invasiva o *in situ* de carcinoma ductal o carcinoma lobular. En otra realización preferente, el tumor mamario se deriva de un sujeto con cáncer mamario recurrente o metastásico.

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 un 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 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 un 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, etc.

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 incluso en 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 a 10.000 células (por ejemplo en aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1.000, 2.500, 5.000, 7.500 ó 10.000 células) utilizando una serie de dilución de concentraciones de anticuerpo de captura.

La expresión "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que llevan a cabo el procedimiento por el que una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una respuesta, implicando 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 RFCE (por ejemplo RFCE/HER-1/ErbB1, HER-2/Neu/ErbB2, HER-3/ErbB3, HER-4/ErbB4), RFCE-1/FLT-1, RFCE-2/FLK-1/KDR, RFCE-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, V-cadherina, LTK (tirosina quinasa de leucocitos), ALK (quinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, RTK 106 y formas truncadas de los receptores de tirosina quinasa tales como p95ErbB2; 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, JNKK, 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; receptores de hormona nuclear tales como el receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), receptor de andrógeno, receptor de glucocorticoide, receptor de mineralocorticoide, receptor de vitamina A, receptor de vitamina D, receptor de retinoide, receptor de hormona tiroidea y receptores huérfanos; coactivadores y represores de receptores nucleares tales como el factor amplificado en cáncer de mama 1 (AIB1) y el correpresor de receptores nucleares 1 (NCOR), respectivamente, y las combinaciones de los mismos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "células circulantes" comprende células extratumorales que han metastizado o micrometastizado 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.).

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), líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa (por ejemplo células tumorales diseminadas del ganglio linfático), líquido aspirado de la médula ósea, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), esputo, líquido de lavado bronquial, lágrimas, líquido aspirado con aguja fina (por ejemplo recolectado mediante aspiración aleatoria periareolar con aguja fina), cualquier otro líquido corporal, una muestra de tejido (por ejemplo tejido tumoral), tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo biopsia con aguja) o un ganglio linfático (por ejemplo biopsia de ganglio linfático centinela) 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 e incluida en parafina (FFPE), por ejemplo de un tumor sólido de mama.

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 de la técnica a los métodos y composiciones de la presente invención. La técnica de la 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 de excisión, la biopsia por incisión, la biopsia con aguja (por ejemplo biopsia por punción con aguja gruesa, biopsia de 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 experto en la materia apreciará que pueden llevarse a cabo técnicas de biopsia para identificar células cancerosas y/o precancerosas en una muestra de tejido dada.

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 (por ejemplo perlas magnéticas, perlas de poliestireno, etc.), 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). En determinados casos, los anticuerpos de captura comprenden etiquetas de captura que interactúan con agentes de captura unidos al soporte sólido. 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.

5 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, tal como un extracto celular de células circulantes de un tumor sólido. 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
10 (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 RFCE, c-KIT, c-Src, FLK-1, RA, RFCDPB, Akt, MAPK, 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 RFCE de receptores de tirosina quinasa y/o la formación de complejos heterodiméricos entre miembros de la familia de RFCE 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: RFCE (RFCEvIII, RFCE fosforilado (p-), RFCE:Shc, RFCE ubiquitinado (u-), p-RFCEvIII); ErbB2 (p95:truncado (Tr)-ErbB2, p-ErbB2, p95:Tr-p-ErbB2, HER-2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:RFCE, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); RE (p-RE (S118, S167)); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); FCDPRa (p-FCDPRa); FCDPRP (p-FCDPRP); FCEVR1 (p-FCEVR1, FCEVR1:PLCg, FCEVR1:Src); FCEVR2 (p-FCEVR2, FCEVR2:PLCy, FCEVR2:Src, FCEVR2:heparina sulfato, FCEVR2:VE-cadherina); FCEVR3 (p-FCEVR3); FCFR1 (pFCFR1); FCFR2 (p-FCFR2); FCFR3 (p-FCFR3); FCFR4 (p-FCFR4); Tiel (p-Tiel); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFkB y/o IKB (p-IK (S32), p-NFkB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad: 14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)) y paxilina (p-paxilina (Y118)).

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.

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

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.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "motivo de desapareamiento" o "región de desapareamiento" se refiere a un oligonucleótido que no presenta una complementariedad del 100% respecto a 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.

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 es Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays", 1993. Generalmente se selecciona que las condiciones restrictivas sean de entre aproximadamente 5°C y 10°C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m 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 T_m , el 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.

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.

El término "incubar" se utiliza como sinónimo de "poner en contacto" y "exponer", y no implica ningún requisito específico de tiempo o temperatura, a menos que se indique lo contrario.

III. Descripción de las realizaciones

En una realización, 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 y composiciones para la selección de terapias apropiadas para regular negativamente o cerrar 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 biológico 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 glóbulos

rojos, glóbulos blancos y/o células circulantes de un tumor sólido tales como células tumorales circulantes (CTC), células endoteliales circulantes (CEC), células progenitoras endoteliales circulantes (CEPC), células madre cancerosas (CSC), 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 remoción (ver, por ejemplo, Meye *et al.*, Int. J. Oncol. 21:521-530, 2002).

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 a 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 (FCE), la heregulina (HRG), TGF- α , PIGF, la angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VFCE, PEDGF, IGF, FGF, HGF, citoquinas y similares. Con el fin de evaluar las potencias terapias anticáncer 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 durante 1 a 5 minutos y 1 a 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 a 360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente 1 a 5 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y (2) aproximadamente 30 a 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, en la Tabla 1.

Tabla 1

RFCE (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	HER-4 (ErbB4) - diana
Cetuximab Panitumumab Matuzumab Nimotuzumab Vacuna de ErbB1	Trastuzumab (Herceptin®) Pertuzumab (ADN) BMS-599626*	Anticuerpo (U3)	
	*Heterodimerización HER-1/2; Fase 1		
RFCE (ErbB1) (B)	HER-2 (ErbB2) (D)	ErbB1/2 (F)	ErbB1/2/4 (G)
Erlotinib Gefitinib EKB 569* CL-387-785**	CP-724714 (Pfizer)	Lapatinib (Tykerb®) HKI-272* HKI-357 (preclínico) BIW 2992**	Canertinib* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth, Irreversible, II CRC) **(Wyeth, Irreversible, Preclínico)		*Wyeth, Irreversible, CPCNP I/II, Mamario ** Boehringer Ingelheim, Irreversible, I/II prostático, ovárico, mamario	*Pfizer, Irreversible, CNCNP II, mamario
Raf (H)	SRC (H)	Mek: (I)	NFkB-IkB (I)

Sorafenib PLX4032 (Plexxikon)	AZ	PD-325901 (II: CPCNP) AZD6244 -Matriz/Az XL518 Exelisis/ADN	
mTor (J)	PI3K (J)	RFCEV2 y RFCEV1 (K)	RFCEV1/2/3:
Rad 001 : Everolimus* Temsirolimus** AP-23573***	PX-866*	Avastina (ADN) HuMV833* FCEV-Trap**	AZD 2171 (CPCNP, CRC) AMG-706 (+ RFCDP)

mTor (J)	PI3K (J)	RFCEV2 y RFCEV1 (K)	RFCEV1/2/3:
*Everolimus (Novartis, combinación con Gefetinib/Erlotinib; I/II: CPCNP, glioblastoma) **Temsirolimus (Wyeth, combinación con Gefetinib/Erlotinib; I/II: CPCNP, glioblastoma) ***AP-23573 (Ariad, I/II: endometrial)	*inhibición específica de P110alfa; ProlX Pharma; CPCNP preclínico	* (PDL) anti-FCVEa **Regeneron/Aventis (mimético de receptor) (fase 2)	
Diana de RFCVE (L)			EPH A-D
DC101* IMC-IC11** IMC1121B Totalmente humanizado CDP-791*** Pazopanib****	CDP-791 (UCB) CP-547632* AG13736** E-7080 (Eisai) CHIR-258*** OSI-930 (+ cKit, RFCDP)	Bay-579352 (+ RFCDP) ABT-869* BMS-540215 (+RFCF1) KRN-951 BBIW	
*Imclone (Fase 2/3?) **IgG1 quimérica contra RFCEV2 ***Celltech, anticuerpo di-Fab pegilado contra R2 **** GSK, mieloma múltiple, ovárico, CCR fase 3 inclusión completa, sarcoma II)	*OSI, PFIZER: (+ ErbB1 + RFCDP) (CPCNP, etapa ovárica 2) **Pfizer: RFCEV1,2 y RFCDPbeta) (CCR II) *** (RFCVE1,2 RFCF3, RFCDP)	*(+CSF1R, Erk, Flt-3, RFCDP)	
RFCVE2/ErbB1/2 (ErbB1)/cMet/RFCF (M)	RFCVE2/3/Raf/RFCDP/cKit/Flt-3 (N)	TIE 1/2	RFCEV2/1/3, Flt-3, cFMS, RFCDP/cKit (O)

ES 2 553 390 T3

ZD6474* XL647** AEE 788***	Sorafenib*		PTK787 (No cFMS, FLT-3) Sunitinib XL-999 SU-6668 (Pfizer) GSK AZ (AZD2171) BMS Novartis (AEE788) Amgen Otros
----------------------------------	------------	--	--

RFCVE2/ErbB1/2 (ErbB1)/cMet/RFCF (M)	RFCVE2/3/Raf/RFCDP/cKit/F It-3 (N)	TIE 1/2	RFCEV2/1/3, Flt-3, cFMS, RFCDP/cKit (O)
*(vandetanib) (Fase III: tiroides, CPNCP **(Exelixis; también EPHB2): (paciente resistente a erlotinib, pacientes asiáticos) (Fase 2) *** (Novartis, fase 1/2)	*(CCR, CHC, CPCNP(III), Melanoma (III))		
Diana de RFCDP (P)	Diana de Abl: (Q)	FTL 3	RET
Tandutinib Nilotinib	Imatinib Dasatinib Nilotinib AT-9283 AZD-0530 Bosutinib		
Diana de kit (R)	RFCH1/2	RFCH1-4	Diana de IGF-1R (S)
AMG-706 XL-880 XL-999		Chiron	Merck Pfizer Novartis
Inhibidores de HSP90:	Fármacos antimitóticos:	Otras dianas:	
IPI-504* 17-AAG**	Docetaxel* Paclitaxel** Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina***	Inhibidores de HDAC BCL2 Quimioterapéuticos (fragmentación) Inhibidores del proteosoma	

*(Infinity Pharma, ErbB1 mutante, mieloma múltiple I/II, GIST) **(Kosan, tumores sólidos I/II)	*(Estabilizador de los microtúbulos; adyuvante y cáncer de mama avanzado; CPCNP, cáncer de próstata independiente de andrógenos) **(Estabilizador de los microtúbulos; Adyuvante y cáncer mamario avanzado; CPCNP, cáncer ovárico, sarcoma de Kaposi asociado al SIDA) *** (Desestabilizadores de los microtúbulos)		
---	---	--	--

En otra realización, 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 y otras proteínas diana. En diversos aspectos, dicha realización incluye matrices que comprenden componentes de rutas de transducción de señales características de tumores particulares, por ejemplo rutas de transducción de señales activas en las células de cáncer de mama. De esta manera, la invención puede ponerse en práctica ventajosamente, en la que cada molécula de transducción de señales u otra proteína de interés con un potencial defecto de expresión o activación que causa cáncer se encuentra representada 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 5 a 9. Los anticuerpos de captura específicos para uno o más componentes de una ruta dada de transducción de señales activa en una célula tumoral particular también pueden imprimirse de manera aleatoria para minimizar cualquier artefacto presente relacionado con la superficie.

Entre los ejemplos no limitativos de rutas de transducción de señales que pueden interrogarse utilizando la presente invención se incluyen los mostrados en la Tabla 2.

Tabla 2

Ruta1	ErbB1	ErbB1 FosFo	ErbB1 Shc	ErbB1 ubiquitina	ErbB1-PI3K	PTEN		
Ruta2	ErbB1	ErbB1 VIII	Fosfo-ErbB1 VIII	ErbB1 VIII Shc	ErbB1 VIII ubiquitina	ErbB1 VII I PI3K	PTEN	
Ruta3	ErbB2	ErbB2 Fosfo	HER-2 Shc	Complejo ErbB2: PI3K	ErbB2 ubiquitina	PTEN		
Ruta4	ErbB2	ErbB2 truncado en p95	Fosfo-ErbB2	fosfo-ERBB2 truncado en P95	HER-2 Shc	Complejo ERBB2:PI3K	ErbB2 ubiquitina	P95ErbB2: PI3K
Ruta5	ErbB3	Fosfo-ErbB3	Complejo ErbB3:PI3K	Fosfo-ErbB3 PI3K	ErbB3:Shc			
Ruta6	ErbB4	Fosfo-ErbB4	ErbB4:Shc					
Ruta7	IGF-1R	Fosfo-IGF-1R	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	Fosfo-IRS	IGF-IR:PI3K		
Ruta8	INSR	Fosfo-INSR						
Ruta9	KIT	Fosfo-KIT						
Ruta10	FLT3	FosfoFLT3						
Ruta11	HGFR 1	Fosfo-RFCH 1						
Ruta12	HGFR 2	Fosfo-RFCH 2						
Ruta13	RET	FosfoRET						

ES 2 553 390 T3

Ruta14	RFCDPalfa	Fosfo-RFCDP-alfa						
Ruta15	RFCDPbeta	Fosfo-RFCDP-beta						
Ruta16	RFCE 1	RFCE 1 Fosfo	Complejo RFCE 1: PLCγ	RFCE 1: Src				
Ruta17	RFCE 2	RFCE 2 Fosfo	Complejo RFCE 2: PLCγ	RFCE 2: Src	Complejo de RFCE-2/heparin sulfato	RFCE-2, complejo de VE cadherina		
Ruta18	RFCE 3	Fosfo-RFCE 3						
Ruta19	RFCE 1	Fosfo-RFCF 1						
Ruta20	FGFR 2	Fosfo-RFCF 2						
Ruta21	FGFR 3	Fosfo-RFCF 3						
Ruta22	FGFR 4	Fosfo-RFCF 4						
Ruta23	TIE 1	Fosfo-TIE 1						
Ruta24	TIE 2	Fosfo-TIE 2						
Ruta25	EPHA	Fosfo-EPHA						
Ruta26	EPHB	Fosfo-EPHB						
Ruta27	Complejo NFκB-IκB	Fosfo-IκB (S32) Total IκB	Total NFκB Fosfo NFκB(S536)	Total P65 IκBa Fosfo P65 IκBa				
Ruta28	ER	Fosfo-RE	ER-AIB1	Otros complejos de RE				
Ruta29	PR	Fosfo-Pr		Complejos de PR				
Ruta30	Ruta de erizo							
Ruta31	Ruta Wnt							
Ruta32	Ruta Notch							
Ruta33	Total Mek Fosfo Mek (S217/S221)	Total Erk Fosfo Erk (T202/Y204)	Total Rsk-1 Fosfo Rsk-1 (T357/S363)	Total Stat3 Fosfo Stat-3 (Y705) (S727) Total Stat 1 Fosfo Stat1 (Y701)	Fosfo Bad (S112) Bad (total)	Total Fak Fosfo Fak (Y576)	Total cSrc FosFo cSrc(Y416)	Total Ras Fosfo-Ras
Ruta34	Akt (Total) Fosfo Akt (T473)	Fosfo Akt (T308)	Fosfo Bad (S112) Bad (total)	Fosfo Bad (S136)	Bad:14-3-3 complejo	Total mTor Fosfo mTor (S2448)	Total p70S6K Fosfo p70S6K (T229) (T389)	GSK3beta Total(Fosfo Ser 9)
Ruta35	Total Jnk	Total	Total Rb	Total p53	Fosfo-	Total c-	Total	

	Fosfo Jnk(T183/ Y 1 85)	P38Fosfo P38 (T180/Y18 2)	Fosfo Rb (S249/T25 2) Fosfo Rb (S780)	Fosfo p53 (S392) Fosfo p53 (S20)	CREB(S1 33) Total CREB	Jun Fosfo- c-Jun; (S63)	Paxilina Fosfo Paxilina (Y118)	
Ruta36	Ki67	Caspasa hendida 3,8,9 otros	TOPO2					
Ruta37	FCTbeta							

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, 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 el presente método 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; Tykerb[®]), 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-hidroximetil-quirosino-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-sn-glicerocarbonato, acetato de 9-metoxi-2-metil-elipticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalín-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosamincarbazona (complejo de Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido 15-mero derivado de los aminoácidos 10 a 24 del protooncogén TCL1 (Hiromura *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, floxuridina, 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 de agentes terapéuticos hormonales se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, inhibidores de aromatasa (por ejemplo aminoglutetimida, anastrozol (Arimidex[®]), letrozol (Femara[®]), vorozol, exemestano (Aromasin[®]), 4-androstén-3,6,17-triona (6OXO), 1,4,6-androstatrién-3,17-diona (ATD), formestano (Lentaron[®]), etc.), moduladores selectivos de receptores de estrógeno (por ejemplo bazedoxifeno, clomifeno, fulvestrant, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, etc.), esteroides (por ejemplo dexametasona), finasterido y agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) tales como goserelina, 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 serie de dilución 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.
- 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, linfa, 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 mamario sólido, tales como CTC, CEC, CEPC, células tumorales diseminadas de ganglio linfático y/o CSC. 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.
- 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 a 360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente 1 a 5 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y (2) aproximadamente 30 a 180 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento. Alternativamente, el lisado celular puede almacenarse a -80°C hasta su utilización.
- 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.
- De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un aspecto la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario, comprendiendo el método:
- (a) aislar células de un tumor mamario tras la administración de un fármaco anticáncer, o previamente a la incubación con un fármaco anticáncer,
 - (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
 - (c) detectar un estado de activación de uno o más analitos en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido, y
 - (d) determinar si el fármaco anticáncer resulta adecuado o inadecuado para el tratamiento del tumor mamario mediante comparación del estado de activación detectado para uno o más analitos con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.
- En determinados casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además enviar o informar de los resultados de la etapa (d) a un médico clínico, por ejemplo a un oncólogo o a un médico general. En determinados otros casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además registrar o almacenar los resultados de la etapa (d) en una base de datos informática u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo en un laboratorio.

En una realización preferente, el método para la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario, comprende:

- (a) aislar células de un tumor mamario tras la administración de un fármaco anticáncer, o previamente a la incubación con un fármaco anticáncer,
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) detectar un estado de activación de uno o más analitos en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido,
- (d) comparar el estado de activación detectado para el analito o analitos con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer, y
- (e) indicación de que el fármaco anticáncer resulta adecuado para el tratamiento del tumor mamario en el caso de que el estado de activación detectado para el analito o analitos se encuentra sustancialmente reducido en comparación con el perfil de activación de referencia.

En determinados casos, el método puede comprender además, a modo de etapa (f), o puede comprender alternativamente, a modo de etapa (e), la etapa de indicar que el fármaco anticáncer resulta inadecuado para el tratamiento del tumor mamario en el caso de que el estado de activación detectado para el analito o analitos no se reduzca sustancialmente en comparación con el perfil de activación de referencia.

En determinados otros casos, la realización preferente puede comprender además enviar o informar de los resultados de la etapa (e) a un médico clínico, por ejemplo a un oncólogo o a un médico general. En todavía otros casos, la realización preferente puede comprender además registrar o almacenar los resultados de la etapa (e) en una base de datos informática u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo en un laboratorio.

En algunas realizaciones, el estado de activación de un analito, tal como una molécula de transducción de señales, se considera "sustancialmente reducida" en presencia de un fármaco anticáncer en el caso de que se encuentre por lo menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ó 95% menos activada que en ausencia del fármaco anticáncer. En otras realizaciones, el estado de activación de un analito, tal como una molécula de transducción de señales, se considera "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer (1) en el caso de que se produzca un cambio de activación alta o fuerte del analito sin el fármaco anticáncer a una activación moderada, débil, baja o muy débil del analito sin el fármaco anticáncer, o (2) en el caso de que se produzca un cambio de activación moderada del analito sin el fármaco anticáncer a una activación débil, baja o muy débil del analito con el fármaco anticáncer.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden comprender además la etapa de obtención de una muestra de un sujeto que presenta un tumor mamario a partir del que se aíslan células de un tumor mamario. La muestra puede obtenerse de un sujeto con cáncer de mama antes del tratamiento con fármaco anticáncer (por ejemplo antes de la incubación con un fármaco anticáncer) o después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo en cualquier momento durante el curso del tratamiento del cáncer). Entre las muestras adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva, líquido aspirado con aguja fina (AGF) y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la muestra es de sangre completa o de AGF. En la presente realización, las células circulantes de un tumor mamario pueden aislarse a partir de la muestra de sangre completa o pueden aislarse células de cáncer mamario a partir de la muestra de AGF. En el caso de que las células aisladas se obtengan de un sujeto que no ha recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, las células aisladas pueden incubarse *in vitro* bajo condiciones adecuadas con un fármaco anticáncer o un cóctel de fármacos anticáncer con diana en uno o más de los analitos que deben detectarse en la etapa (c).

Las células circulantes de un tumor mamario pueden aislarse a partir de una muestra mediante cualquier técnica conocida de la técnica, por ejemplo mediante separación inmunomagnética, el sistema CellTracks®, separación de microfluidos, FACS, centrifugación en gradiente de densidad y métodos de depleción (ver el Ejemplo 1). Entre los ejemplos de célula circulantes que pueden aislarse a partir de una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales circulantes, células madre cancerosas, células tumorales diseminadas y combinaciones de las mismas. Pueden lisarse células aisladas, tales como células circulantes, para transformar de esta manera las células aisladas en un extracto celular mediante cualquier técnica conocida (ver el Ejemplo 1).

En una realización, el tumor mamario se deriva de un sujeto con carcinoma ductal o con carcinoma lobular. Entre los ejemplos de carcinoma ductal se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma ductal *in situ*. Entre los ejemplos no limitativos de carcinoma lobular se incluyen el carcinoma lobular invasivo o el carcinoma lobular *in situ*.

En determinados casos, las células de un tumor mamario se aíslan a partir de tejido tumoral. El tejido tumoral puede ser, por ejemplo, tejido tumoral primario o tejido tumoral metastásico. En una realización preferente, las células se aíslan a partir de tejido tumoral en forma de una muestra de líquido aspirado con aguja fina (AGF).

En algunas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento tal como se indica en la presente memoria. En otras realizaciones, el fármaco anticáncer puede comprender uno o más de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas.

En realizaciones preferentes, el analito o analitos presentes en el extracto celular comprenden una pluralidad de moléculas de transducción de señales. Entre los ejemplos de moléculas de transducción de señales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, receptores de tirosina quinasa, no receptores de tirosina quinasa, componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa, receptores de hormona nuclear, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos. En determinados casos, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona de entre el grupo que consiste de RFCE (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VFCE, RFCE-1, RFCE-2, RFCE-3, Eph-a, Ephb, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 y combinaciones de los mismos. Preferentemente, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona de entre el grupo que consiste de ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, RFCE1, RFCE-2, RFCE-3, ER, PR y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el estado de activación detectado para el analito o analitos presentes en el extracto celular puede ser, por ejemplo, un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de acomplejamiento o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, vidrio, plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibras y combinaciones de los mismos. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos de captura se fijan sobre el soporte sólido en orden direccionable.

En determinados aspectos, el ensayo en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular con la pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados (por ejemplo para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y los anticuerpos de captura),
- (ii) incubar (por ejemplo poner en contacto) 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 (por ejemplo para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos dependientes del estado de activación),
- (iii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y un segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

En algunos casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación comprenden un primer miembro de una pareja de unión (por ejemplo biotina). En otros casos, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales (por ejemplo una peroxidasa tal como PRP) comprende un segundo miembro de la pareja de unión (por ejemplo estreptavidina). En determinados casos, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidasas marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinadas otras realizaciones, el ensayo en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular con la pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados (por ejemplo para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y los anticuerpos de captura),

(ii) incubar (por ejemplo poner en contacto) 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 dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos de detección), en el que los anticuerpos independientes de estado de activación se marcan 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 glucosa oxidasa facilitadora genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro de la pareja de amplificación de señal,

(iii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro de la pareja de amplificación de señal para generar una señal amplificada, y

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

Los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse directamente con la fracción facilitadora o marcarse indirectamente con la fracción facilitadora, por ejemplo mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con la fracción facilitadora. De manera similar, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse directamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales o marcarse indirectamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señal, por ejemplo mediante unión entre un primer miembro de una pareja de unión conjugado 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 señal. En determinados casos, el primer miembro de la pareja de unión es biotina y el segundo miembro de la pareja de unión es una avidina, tal como estreptavidina o neutravidina.

En algunas realizaciones, la fracción facilitadora puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo, tal como se indica en, por ejemplo, los Ejemplos 16 y 17. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo presenta un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (por ejemplo de aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 ó 750 kDa). En otras realizaciones, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En todavía otras realizaciones, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP). En realizaciones adicionales, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidases marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinados casos, la peroxidasa de rábano picante y los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo típicamente presente un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo de aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 kDa).

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para ayudar o asistir en la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar la respuesta de un tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- (a) aislar células de un tumor mamario tras la administración de un fármaco anticáncer, o previamente a la incubación con un fármaco anticáncer,
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) detectar un estado de activación de uno o más analitos en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido, y
- (d) determinar si el tumor mamario responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante comparación del estado de activación detectado para uno o más analitos con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

En determinados casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además enviar o informar de los resultados de la etapa (d) a un médico clínico, por ejemplo a un oncólogo o a un médico general. En determinados otros casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además registrar o almacenar los resultados de la etapa (d) en una base de datos informática u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo en un laboratorio.

En una realización preferente, el método para identificar la respuesta a un tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer comprende:

- (a) aislar células de un tumor mamario tras la administración de un fármaco anticáncer, o previamente a la incubación con un fármaco anticáncer,
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) detectar un estado de activación de uno o más analitos en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido,
- (d) comparar el estado de activación detectado para el analito o analitos con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer, y
- (e) indicar que el tumor mamario responde al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el estado de activación detectado para el analito o analitos se encuentre sustancialmente reducido en comparación con el perfil de activación de referencia.

En determinados casos, la realización preferente puede comprender además, a modo de etapa (f), o puede comprender alternativamente, a modo de etapa (e), la etapa de indicar que el tumor mamario no es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el estado de activación detectado para el analito o analitos no se reduzca sustancialmente en comparación con el perfil de activación de referencia.

En determinados otros casos, la realización preferente puede comprender además enviar o informar de los resultados de la etapa (e) a un médico clínico, por ejemplo a un oncólogo o a un médico general. En todavía otros casos, la realización preferente puede comprender además registrar o almacenar los resultados de la etapa (e) en una base de datos informática u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo en un laboratorio.

El estado de activación de un analito (por ejemplo una molécula de transducción de señales) puede "reducirse sustancialmente" en presencia de un fármaco anticáncer tal como se ha indicado anteriormente. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además la etapa de obtención de una muestra de un sujeto que presenta un tumor mamario a partir del que se aíslan células de cáncer de mama. La muestra puede obtenerse de un sujeto con cáncer de mama antes del tratamiento con fármaco anticáncer (por ejemplo antes de la incubación con un fármaco anticáncer) o después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo en cualquier momento durante el curso del tratamiento del cáncer). Entre las muestras adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva, líquido aspirado con aguja fina (AGF) y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la muestra es de sangre completa o de AGF. En la presente realización, las células circulantes de un tumor mamario pueden aislarse a partir de la muestra de sangre completa o pueden aislarse células de cáncer mamario a partir de la muestra de AGF. En el caso de que las células aisladas se obtengan de un sujeto que no ha recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, las células aisladas pueden incubarse *in vitro* bajo condiciones adecuadas con un fármaco anticáncer o un cóctel de fármacos anticáncer con diana en uno o más de los analitos que deben detectarse en la etapa (c).

Las células circulantes de un tumor mamario pueden aislarse a partir de una muestra mediante cualquier técnica conocida de la técnica, por ejemplo mediante separación inmunomagnética, el sistema CellTracks®, separación de microfluidos, FACS, centrifugación en gradiente de densidad y métodos de eliminación (ver el Ejemplo 1). Entre los ejemplos de célula circulantes que pueden aislarse a partir de una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales circulantes, células madre cancerosas, células tumorales diseminadas y combinaciones de las mismas. Pueden lisarse células aisladas, tales como células circulantes, para transformar de esta manera las células aisladas en un extracto celular mediante cualquier técnica conocida (ver el Ejemplo 1).

En algunas realizaciones, el tumor mamario se deriva de un sujeto con carcinoma ductal o con carcinoma lobular. Entre los ejemplos de carcinoma ductal se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma ductal *in situ*. Entre los ejemplos no limitativos de carcinoma lobular se incluyen el carcinoma lobular invasivo o el carcinoma lobular *in situ*.

En determinados casos, las células de un tumor mamario se aíslan a partir de tejido tumoral. El tejido tumoral puede ser, por ejemplo, tejido tumoral primario o tejido tumoral metastásico. En una realización preferente, las células se aíslan a partir de tejido tumoral en forma de una muestra de líquido aspirado con aguja fina (AGF).

En algunas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento tal como se indica en la presente memoria. En otras realizaciones, el fármaco anticáncer puede comprender uno o más de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas.

En realizaciones preferentes, el analito o analitos presentes en el extracto celular comprenden una pluralidad de moléculas de transducción de señales. Entre los ejemplos de moléculas de transducción de señales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, receptores de tirosina quinasa, no receptores de tirosina quinasa, componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa, receptores de hormona nuclear, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos. En determinados casos, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona de entre el grupo que consiste de RFCE (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VFCE, RFCE-1, RFCE-2, RFCE-3, Eph-a, Ephb, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 y combinaciones de los mismos. Preferentemente, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona de entre el grupo que consiste de ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, RFCE1, RFCE-2, RFCE-3, ER, PR y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el estado de activación detectado para el analito o analitos presentes en el extracto celular puede ser, por ejemplo, un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de acomplejamiento o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, vidrio, plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibras y combinaciones de los mismos. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos de captura se fijan sobre el soporte sólido en orden direccionable.

En determinadas realizaciones, el ensayo en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular con la pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados (por ejemplo para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y los anticuerpos de captura),
- (ii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes, formando una pluralidad e analitos capturados detectables (por ejemplo para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos dependientes del estado de activación),
- (iii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y un segundo miembros de la pareja de amplificación de señales con el fin de generar una señal amplificada, y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

En algunos casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación comprenden un primer miembro de una pareja de unión (por ejemplo biotina). En otros casos, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales (por ejemplo una peroxidasa tal como PRP) comprende un segundo miembro de la pareja de unión (por ejemplo estreptavidina). En determinados casos, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidases marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinadas otras realizaciones, el ensayo en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular con la pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados (por ejemplo para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y los anticuerpos de captura),
- (ii) incubar (por ejemplo poner en contacto) 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 dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos de detección), en el que los anticuerpos independientes de estado de activación se marcan 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 glucosa oxidasa facilitadora genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales,

(iii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro de la pareja de amplificación de señal para generar una señal amplificada, y

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

Los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse directamente con la fracción facilitadora o marcarse indirectamente con la fracción facilitadora, por ejemplo mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con la fracción facilitadora. De manera similar, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse directamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales o marcarse indirectamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señal, por ejemplo mediante unión entre un primer miembro de una pareja de unión conjugado 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 señal. En determinados casos, el primer miembro de la pareja de unión es biotina y el segundo miembro de la pareja de unión es una avidina, tal como estreptavidina o neutravidina.

En algunas realizaciones, la fracción facilitadora puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo, tal como se indica en, por ejemplo, los Ejemplos 16 y 17. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo presenta un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (por ejemplo aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 ó 750 kDa). En otras realizaciones, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En todavía otras realizaciones, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP). En realizaciones adicionales, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidases marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinados casos, la peroxidasa de rábano picante y los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo típicamente presente un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo de aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 kDa).

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para ayudar o asistir en la identificación de una respuesta del tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la identificación de una respuesta del tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer.

En todavía otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto que presenta un tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- (a) aislar células de un tumor mamario tras la administración de un fármaco anticáncer, o previamente a la incubación con un fármaco anticáncer,
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) detectar un estado de activación de uno o más analitos en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos de uno o más analitos, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido, y
- (d) predecir la probabilidad de que el sujeto responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante comparación del estado de activación detectado para uno o más analitos con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

En determinados casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además enviar o informar de los resultados de la etapa (d) a un médico clínico, por ejemplo a un oncólogo o a un médico general. En determinados

otros casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además registrar o almacenar los resultados de la etapa (d) en una base de datos informática u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo en un laboratorio.

En una realización preferente, el método para predecir la respuesta de un sujeto que presenta un tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer comprende:

(a) aislar células de un tumor mamario tras la administración de un fármaco anticáncer, o previamente a la incubación con un fármaco anticáncer,

(b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,

(c) detectar un estado de activación de uno o más analitos en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una pluralidad

de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para el analito o analitos, en el que los anticuerpos de captura se fijan sobre un soporte sólido,

(d) comparar el estado de activación detectado para el analito o analitos con un perfil de activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer, y

(d) indicación de que el sujeto probablemente responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el estado de activación detectado para el analito o analitos se encuentre sustancialmente reducido en comparación con el perfil de activación de referencia.

En determinados casos, la realización preferente puede comprender además, a modo de etapa (f), o puede comprender alternativamente, a modo de etapa (e), la etapa de indicar que es probable que el sujeto no responda (por ejemplo es improbable o presenta una probabilidad baja de responder) al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el estado de activación detectado para el analito o analitos no se reduzca sustancialmente en comparación con el perfil de activación de referencia.

En determinados otros casos, la realización preferente puede comprender además enviar o informar de los resultados de la etapa (e) a un médico clínico, por ejemplo a un oncólogo o a un médico general. En todavía otros casos, la realización preferente puede comprender además registrar o almacenar los resultados de la etapa (e) en una base de datos informática u otro aparato o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo en un laboratorio.

El estado de activación de un analito (por ejemplo una molécula de transducción de señales) puede "reducirse sustancialmente" en presencia de un fármaco anticáncer tal como se ha indicado anteriormente. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender además la etapa de obtención de una muestra de un sujeto que presenta un tumor mamario a partir del que se aíslan células de cáncer de mama. La muestra puede obtenerse de un sujeto con cáncer de mama antes del tratamiento con fármaco anticáncer (por ejemplo antes de la incubación con un fármaco anticáncer) o después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo en cualquier momento durante el curso del tratamiento del cáncer). Entre las muestras adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva, líquido aspirado con aguja fina (AGF) y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la muestra es de sangre completa o de AGF. En la presente realización, las células circulantes de un tumor mamario pueden aislarse a partir de la muestra de sangre completa o pueden aislarse células de cáncer mamario a partir de la muestra de AGF. En el caso de que las células aisladas se obtengan de un sujeto que no ha recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, las células aisladas pueden incubarse *in vitro* bajo condiciones adecuadas con un fármaco anticáncer o un cóctel de fármacos anticáncer con diana en uno o más de los analitos que deben detectarse en la etapa (c).

Las células circulantes de un tumor mamario pueden aislarse a partir de una muestra mediante cualquier técnica conocida de la técnica, por ejemplo mediante separación inmunomagnética, el sistema CellTracks[®], separación de microfluidos, FACS, centrifugación en gradiente de densidad y métodos de depleción (ver el Ejemplo 1). Entre los ejemplos de célula circulantes que pueden aislarse a partir de una muestra se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células tumorales circulantes, células endoteliales circulantes, células progenitoras endoteliales circulantes, células madre cancerosas, células tumorales diseminadas y combinaciones de las mismas. Pueden lisarse células aisladas, tales como células circulantes, para transformar de esta manera las células aisladas en un extracto celular mediante cualquier técnica conocida (ver el Ejemplo 1).

En algunas realizaciones, el tumor mamario se deriva de un sujeto con carcinoma ductal o con carcinoma lobular. Entre los ejemplos de carcinoma ductal se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma ductal *in situ*. Entre los ejemplos no limitativos de carcinoma lobular se incluyen el carcinoma lobular invasivo o el carcinoma lobular *in situ*.

En determinados casos, las células de un tumor mamario se aíslan a partir de tejido tumoral. El tejido tumoral puede ser, por ejemplo, tejido tumoral primario o tejido tumoral metastásico. En una realización preferente, las células se aíslan a partir de tejido tumoral en forma de una muestra de líquido aspirado con aguja fina (AGF).

En algunas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento tal como se indica en la presente memoria. En otras realizaciones, el fármaco anticáncer puede comprender uno o más de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas.

En realizaciones preferentes, el analito o analitos presentes en el extracto celular comprenden una pluralidad de moléculas de transducción de señales. Entre los ejemplos de moléculas de transducción de señales se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, receptores de tirosina quinasa, receptores de hormona nuclear, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos. En determinados casos, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona de entre el grupo que consiste de RFCE (ErbB1), HER-2 (ErbB2), p95ErbB2, HER-3 (ErbB3), HER-4 (ErbB4), Raf, SRC, Mek, NFkB-IkB, mTor, PI3K, VFCE, RFCE-1, RFCE-2, RFCE-3, Eph-a, Ephb, Eph-c, Eph-d, cMet, FGFR, cKit, Flt-3, Tie-1, Tie-2, Flt-3, cFMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, Kit, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1 y combinaciones de los mismos. Preferentemente, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona de entre el grupo que consiste de ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, RFCE1, RFCE-2, RFCE-3, ER, PR y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, el estado de activación detectado para el analito o analitos presentes en el extracto celular puede ser, por ejemplo, un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de acomplejamiento o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, vidrio, plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibras y combinaciones de los mismos. En todavía otras realizaciones, los anticuerpos de captura se fijan sobre el soporte sólido en orden direccionable.

En determinadas realizaciones, el ensayo en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular con la pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados (por ejemplo para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y los anticuerpos de captura),
- (ii) incubar (por ejemplo poner en contacto) 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 (por ejemplo para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos dependientes del estado de activación),
- (iii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un primer y un segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

En algunos casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación comprenden un primer miembro de una pareja de unión (por ejemplo biotina). En otros casos, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales (por ejemplo una peroxidasa tal como PRP) comprende un segundo miembro de la pareja de unión (por ejemplo estreptavidina). En determinados casos, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidases marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinadas otras realizaciones, el ensayo en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular con la pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados (por ejemplo para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y los anticuerpos de captura),
- (ii) incubar (por ejemplo poner en contacto) 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 dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes, formando una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos de detección), en el que los anticuerpos independientes de estado de activación se marcan 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,

(iii) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro de la pareja de amplificación de señal para generar una señal amplificada, y
(iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

Los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse directamente con la fracción facilitadora o marcarse indirectamente con la fracción facilitadora, por ejemplo mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con la fracción facilitadora. De manera similar, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse directamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales o marcarse indirectamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señal, por ejemplo mediante unión entre un primer miembro de una pareja de unión conjugado 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 señal. En determinados casos, el primer miembro de la pareja de unión es biotina y el segundo miembro de la pareja de unión es una avidina, tal como estreptavidina o neutravidina.

En algunas realizaciones, la fracción facilitadora puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo, tal como se indica en, por ejemplo, los Ejemplos 16 y 17. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo presenta un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (por ejemplo aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 ó 750 kDa). En otras realizaciones, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En todavía otras realizaciones, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP). En realizaciones adicionales, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidases marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinados casos, la peroxidasa de rábano picante y los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo típicamente presenta un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo de aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 kDa).

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para ayudar o asistir en la predicción de la probabilidad de que un sujeto responda al tratamiento con un fármaco anticáncer. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la predicción de la probabilidad de que un sujeto responda al tratamiento con un fármaco anticáncer.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una matriz que presenta un rango dinámico superior que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura inmovilizados sobre un soporte sólido, en el 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 u otra proteína (por ejemplo un receptor de hormona nuclear) en un extracto celular.

En determinadas realizaciones, la ruta de transducción de señales puede estar implicada en la proliferación celular. En dichas realizaciones, los anticuerpos de captura pueden comprender, por ejemplo, uno o más miembros seleccionados de entre el grupo que consiste de anticuerpos reactivos con IGFIR, cMET, ErbB1, ErbB2, p95ErbB2, ErbB3, ErbB4, Shc, PI3K, Erk, Rsk, Akt, p70S6K, RE, RP, NCOR y AIB1. En determinadas realizaciones, la ruta de transducción de señales puede estar implicada en la angiogénesis tumoral. En dichas realizaciones, los anticuerpos de captura pueden comprender, por ejemplo, uno o más miembros seleccionados de entre el grupo que consiste de anticuerpos reactivos con Shc, PI3K, Erk, Rsk, Akt, p70S6K, RFCEV-1, RFCEV-2, Tie 2, complejo de cadherina V-

R2, RFCDPA y RFCDPB. De esta manera, las matrices direccionables descritas en la presente memoria resultan particularmente útiles para determinar la expresión y/o estado de activación de moléculas de transducción de señales y otras proteínas implicadas en el cáncer de mama.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia (o la ausencia) de un receptor truncado, comprendiendo el método:

(a) incubar (por ejemplo poner en contacto) un extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (DEC) de un receptor de longitud completa,

(b) separar la pluralidad de perlas del extracto celular, separando de esta manera el receptor de longitud completa para formar un extracto celular sin el receptor de longitud completa (por ejemplo para transformar el extracto celular en un extracto celular sin un receptor de longitud completa específico o familia de receptores de longitud completa),

(c) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular sin el receptor de longitud completa con una pluralidad de anticuerpos de captura, en el que la pluralidad de anticuerpos de captura es específica de una región de unión a dominio intracelular (DIC) de un receptor truncado y en el que la pluralidad de anticuerpos de captura se inmoviliza sobre un soporte sólido para formar una pluralidad de receptores truncados capturados (por ejemplo para transformar el receptor truncado presente en un extracto celular con reducción de la cantidad receptores de longitud completa en complejos de receptores truncados y anticuerpos de captura),

(d) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección específicos para los receptores truncados correspondientes para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables (por ejemplo para transformar los complejos de receptores truncados capturados en complejos de receptores truncados capturados detectables que comprenden los receptores truncados capturados y anticuerpos dependientes del estado de activación),

(e) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un primer y segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y

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

El receptor truncado típicamente es un fragmento del receptor de longitud completa y comparte una región de unión a dominio intracelular (DIC) con el receptor de longitud completa. En determinadas realizaciones, el receptor de longitud completa puede comprender una región de unión a dominio extracelular (DEC), un dominio transmembranal y una región de unión a dominio intracelular (DIC). Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el receptor truncado puede aparecer mediante el procesamiento proteolítico del DEC del receptor de longitud completa o mediante inicio alternativo de la traducción a partir de residuos de metionina que se encuentran localizados antes, dentro o después del dominio transmembranal, por ejemplo para crear un receptor truncado con un DEC acortado o un receptor truncado que comprende un fragmento DIC asociado a membrana o citosólico.

En determinadas realizaciones preferentes, el receptor truncado es p95ErbB2 y el receptor de longitud completa correspondiente es ErbB2 (HER-2). Sin embargo, el experto en la materia apreciará que los métodos descritos en la presente memoria para detectar proteínas truncadas pueden aplicarse a varias proteínas diferentes, entre ellas, aunque sin limitación, el mutante V111 del RFCE (que participa en el glioblastoma, el cáncer colorrectal, etc.), otros receptores tirosina quinasa truncados, caspasas y similares. El Ejemplo 12 proporciona una realización ejemplar de los métodos de ensayo de la presente invención para detectar receptores truncados tales como p95ErbB2 en células circulantes raras utilizando un ELISA de micromatrices de detección individual de alto rendimiento multiplexado con un rango dinámico superior.

En algunas realizaciones, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a DEC puede comprender una pareja de estreptavidina-biotina, en la que la estreptavidina se encuentra unida a la perla y la biotina se encuentra unida al anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo es específico para la región de unión a DEC del receptor de longitud completa. En otras realizaciones, el extracto celular puede producirse lisando células circulantes de un tumor sólido, tal como, por ejemplo, un tumor mamario. Las células circulantes pueden aislarse a partir de una muestra mediante cualquier técnica descrita en la presente memoria, por ejemplo mediante separación inmunomagnética. Entre las muestras adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva, líquido aspirado con aguja fina y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la muestra es de sangre completa. Alternativamente, el extracto celular puede producirse lisando células circulantes de un tumor sólido, tal como, por ejemplo, tejido de tumor mamario. El tejido tumoral puede ser, por ejemplo, tejido tumoral primario o tejido tumoral metastásico. En una realización preferente, las células se aíslan a partir de tejido tumoral en forma de una muestra de líquido aspirado con aguja fina (AGF).

En algunas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento tal como se indica en la presente memoria. En otras realizaciones, las células aisladas pueden incubarse con un fármaco anticáncer antes de la estimulación con factores de crecimiento. Entre los fármacos anticáncer adecuados se incluyen uno o más de

los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas.

En determinadas realizaciones, se interroga un estado de activación de la pluralidad de receptores truncados capturados detectables. El estado de activación que debe interrogarse puede ser, por ejemplo, un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de acomplejamiento o combinaciones de los mismos. En determinadas otras realizaciones, el soporte sólido en el que puede inmovilizarse la pluralidad de anticuerpos capturados puede comprender, por ejemplo, vidrio, plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibras y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la pluralidad de anticuerpos de captura se fijan sobre el soporte sólido en un orden direccionable.

En algunos casos, los anticuerpos de detección comprenden un primer miembro de una pareja de unión (por ejemplo biotina). En otros casos, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales (por ejemplo una peroxidasa tal como PRP) comprende un segundo miembro de la pareja de unión (por ejemplo estreptavidina). En determinados casos, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidasas marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia (o la ausencia) de un receptor truncado, comprendiendo el método:

- (a) incubar (por ejemplo poner en contacto) un extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (DEC) de un receptor de longitud completa,
- (b) separar la pluralidad de perlas del extracto celular, separando de esta manera el receptor de longitud completa para formar un extracto celular sin el receptor de longitud completa (por ejemplo para transformar el extracto celular en un extracto celular sin un receptor de longitud completa específico o familia de receptores de longitud completa),
- (c) incubar (por ejemplo poner en contacto) el extracto celular sin el receptor de longitud completa con una pluralidad de anticuerpos de captura, en el que la pluralidad de anticuerpos de captura es específica de una región de unión a dominio intracelular (DIC) de un receptor truncado y en el que la pluralidad de anticuerpos de captura se inmoviliza sobre un soporte sólido para formar una pluralidad de receptores truncados capturados (por ejemplo para transformar el receptor truncado presente en un extracto celular con reducción de la cantidad de receptores de longitud completa en complejos de receptores truncados y anticuerpos de captura),
- (d) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación y una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los receptores truncados correspondientes con el fin de formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables (por ejemplo para transformar los complejos de receptores truncados capturados en complejos de receptores capturados detectables que comprenden los receptores truncados capturados y anticuerpos de detección), en el que los anticuerpos independientes de estado de activación se marcan 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 señales,
- (e) incubar (por ejemplo poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro de la pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
- (f) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales.

El receptor truncado típicamente es un fragmento del receptor de longitud completa y comparte una región de unión a dominio intracelular (DIC) con el receptor de longitud completa. En determinadas realizaciones, el receptor de longitud completa puede comprender una región de unión a dominio extracelular (DEC), un dominio transmembranal y una región de unión a dominio intracelular (DIC). Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el receptor truncado puede aparecer mediante el procesamiento proteolítico del DEC del receptor de longitud completa o mediante inicio alternativo de la traducción a partir de residuos de metionina que se encuentran localizados antes, dentro o después del dominio transmembranal, por ejemplo para crear un receptor truncado con un DEC acortado o un receptor truncado que comprende un fragmento DIC asociado a membrana o citosólico.

En determinadas realizaciones preferentes, el receptor truncado es p95ErbB2 y el receptor de longitud completa correspondiente es ErbB2 (HER-2). Sin embargo, el experto en la materia apreciará que los métodos descritos en la

presente memoria para detectar proteínas truncadas pueden aplicarse a varias proteínas diferentes, entre ellas, aunque sin limitación, el mutante V111 del RFCE (que participa en el glioblastoma, el cáncer colorrectal, etc.), otros receptores tirosina quinasa truncados, caspasas y similares. El Ejemplo 12 proporciona una realización ejemplar de los métodos de ensayo de la presente invención para detectar receptores truncados tales como p95ErbB2 en células circulantes raras utilizando un ELISA de micromatrices de detección individual de alto rendimiento multiplexado con un rango dinámico superior.

En algunas realizaciones, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a DEC puede comprender una pareja de estreptavidina-biotina, en la que la estreptavidina se encuentra unida a la perla y la biotina se encuentra unida al anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo es específico para la región de unión a DEC del receptor de longitud completa. En otras realizaciones, el extracto celular puede producirse lisando células circulantes de un tumor sólido, tal como, por ejemplo, un tumor mamario. Las células circulantes pueden aislarse a partir de una muestra mediante cualquier técnica descrita en la presente memoria, por ejemplo mediante separación inmunomagnética. Entre las muestras adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, sangre completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva, líquido aspirado con aguja fina y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, la muestra es de sangre completa. Alternativamente, el extracto celular puede producirse lisando células circulantes de un tumor sólido, tal como, por ejemplo, tejido de tumor mamario. El tejido tumoral puede ser, por ejemplo, tejido tumoral primario o tejido tumoral metastásico. En una realización preferente, las células se aíslan a partir de tejido tumoral en forma de una muestra de líquido aspirado con aguja fina (AGF).

En algunas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento tal como se indica en la presente memoria. En otras realizaciones, las células aisladas pueden incubarse con un fármaco anticáncer antes de la estimulación con factores de crecimiento. Entre los fármacos anticáncer adecuados se incluyen uno o más de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas.

En determinadas realizaciones, se interroga un estado de activación de la pluralidad de receptores truncados capturados detectables. El estado de activación que debe interrogarse puede ser, por ejemplo, un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de acomplejamiento o combinaciones de los mismos. En determinadas otras realizaciones, el soporte sólido en el que puede inmovilizarse la pluralidad de anticuerpos capturados puede comprender, por ejemplo, vidrio, plástico, chips, agujas, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibras y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales, la pluralidad de anticuerpos de captura se fijan sobre el soporte sólido en un orden direccionable.

Los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse directamente con la fracción facilitadora o marcarse indirectamente con la fracción facilitadora, por ejemplo mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con la fracción facilitadora. De manera similar, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse directamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales o marcarse indirectamente con el primer miembro de la pareja de amplificación de señal, por ejemplo mediante unión entre un primer miembro de una pareja de unión conjugado 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. En determinados casos, el primer miembro de la pareja de unión es biotina y el segundo miembro de la pareja de unión es una avidina, tal como estreptavidina o neutravidina.

En algunas realizaciones, la fracción facilitadora puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo, tal como se indica en, por ejemplo, los Ejemplos 16 y 17. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo presenta un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (por ejemplo de aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 ó 750 kDa). En otras realizaciones, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En todavía otras realizaciones, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano picante (HRP). En realizaciones adicionales, el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa de biotina-tiramida con el fin de producir una tiramida activada (por ejemplo para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo tras la adición de un reactivo de detección de señales. Entre los ejemplos no limitativos de reactivos detectores de señales se incluyen los fluoróforos marcados con estreptavidina y las combinaciones de peroxidases marcadas con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En determinados casos, la peroxidasa de rábano picante y los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo típicamente presente un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo de aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 kDa).

En algunas realizaciones, los métodos de ensayo de la presente invención para detectar la presencia (o la ausencia o el nivel) de un receptor truncado tal como p95ErbB2, que pueden resultar útiles para ayudar o asistir en el diagnóstico y pronóstico del cáncer, o en el diseño de tratamientos para el cáncer, por ejemplo ayudando o asistiendo en: (i) la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario, (ii) la identificación de la respuesta de un tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer, o (iii) la predicción de la probabilidad de un sujeto de responder al tratamiento con un fármaco anticáncer.

En otras realizaciones, los métodos de ensayo de la presente invención para detectar la presencia (o la ausencia o el nivel) de un receptor truncado tal como p95ErbB2 pueden resultar útiles para mejorar el diagnóstico y pronóstico del cáncer, o el diseño de tratamientos para el cáncer, por ejemplo mediante la mejora de: (i) la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un tumor mamario, (ii) la identificación de la respuesta de un tumor mamario al tratamiento con un fármaco anticáncer, o (iii) la predicción de la probabilidad de un sujeto de responder al tratamiento con un fármaco anticáncer.

IV. Cáncer de mama

El cáncer de mama es la quinta causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo, después del cáncer de pulmón, cáncer de estómago, cáncer de hígado y cáncer de colon. En 2005, el cáncer de mama causó 502.000 muertes en todo el mundo. Entre mujeres a escala global, el cáncer de mama es la causa más común de muerte por cáncer.

En los Estados Unidos, el cáncer de mama es la tercera causa más común de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón y el cáncer de colon. En 2007, el cáncer de mama causó más de 40.000 muertes en los Estados Unidos. Entre mujeres en los Estados Unidos, el cáncer de mama es el cáncer más común y la segunda causa más común de muerte por cáncer. De hecho, las mujeres en los Estados Unidos presentan una probabilidad entre 8 de desarrollar a lo largo de su vida cáncer de mama invasivo y una probabilidad entre 33 de que el cáncer de mama sea mortal.

El número de casos de cáncer de mama en todo el mundo se ha incrementado significativamente en los años 70, un fenómeno atribuido en parte a los estilos de vida modernos en el mundo occidental. Debido a que la mama está compuesta de tejidos idénticos en hombres y mujeres, el cáncer de mama también aparece en hombres, aunque es menos común.

Clasificación

Los cánceres de mama pueden describirse utilizando cuatro esquemas de clasificación diferentes, cada uno basado en los criterios siguientes:

1. Patología. El patólogo puede categorizar cada tumor basándose en su apariencia histológica y en otros criterios. Los tipos patológicos más comunes de cáncer de mama son el carcinoma ductal invasivo y el carcinoma lobular invasivo.

2. Grado del tumor. El grado histológico puede ser determinado por el patólogo al microscopio. Un tumor bien diferenciado (de grado bajo) es similar al tejido normal. Un tumor pobremente diferenciado (grado alto) está compuesto de células desorganizadas y no presenta la apariencia de tejido normal. Los tumores moderadamente diferenciados (grado intermedio) se encuentran en un punto intermedio.

3. Estatus de proteínas y expresión génica. Los cánceres de mama pueden someterse a ensayo para la expresión y/o activación de moléculas de transducción de señales tales como, por ejemplo, el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) y Her2/Neu/ErbB2. Tal como se ha descrito en la presente memoria, el perfil de expresión de un tumor dado ayuda en la predicción de su pronóstico y asiste al oncólogo en la selección del tratamiento más apropiado.

4. Estadio del tumor. Los cánceres de mama pueden estadificarse según el sistema de clasificación TNM:

- a. Tumor. Cinco valores (Tis, T1, T2, T3 ó T4), dependiendo de la presencia o ausencia de cáncer invasivo, las dimensiones del cáncer invasivo, y la presencia o ausencia de invasión fuera de la mama (por ejemplo en la piel de la mama o en el músculo o caja torácica subyacente).

- b. Ganglio linfático. Cuatro valores (N0, N1, N2 ó N3), dependiendo del número, tamaño y localización de los depósitos metastásicos en ganglios linfáticos.

- c. Metástasis. Dos valores (M0 ó M1), dependiendo de la presencia o ausencia de metástasis diferentes de las de ganglios linfáticos (metástasis denominadas distantes, por ejemplo en hueso, cerebro, pulmón, etc.).

Patología

Con respecto a la patología, la clasificación de la Organización Mundial de la Salud de los tumores de mama fija los tipos histológicos siguientes:

- 5 1. Carcinomas de mama invasivos, tales como el carcinoma ductal invasivo (por ejemplo el carcinoma de tipo basal, el carcinoma de tipo mixto, el carcinoma pleomórfico, el carcinoma con células gigantes osteoclasticas, el carcinoma con características coriocarcinomatosas, el carcinoma con características melanóticas), el carcinoma lobular invasivo, el carcinoma tubular, el carcinoma cribiforme invasivo, el carcinoma medular, el carcinoma mucinoso y otros tumores con abundante mucina (por ejemplo el carcinoma mucinoso, el cistadenocarcinoma y el carcinoma mucinosa de células columnares y el carcinoma de células en anillo de sello gástrico), los tumores neuroendocrinos (por ejemplo el carcinoma neuroendocrino sólido (carcinoide de mama), el tumor carcinoide atípico, el carcinoma de células pequeñas o células en avena y el carcinoma neuroendocrino de células grandes), el carcinoma papilar invasivo, el carcinoma micropapilar invasivo, el carcinoma apocrino, los carcinomas metaplásicos (por ejemplo los carcinomas metaplásicos mixtos epiteliales/mesenquimales o los carcinomas metaplásicos epiteliales puros tales como el carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma con metaplasia de células fusiformes, el carcinoma adenoescamoso y el carcinoma mucoepidermoide), el carcinoma rico en lípidos, el carcinoma secretor, el carcinoma oncocítico, el carcinoma quístico adenoide, el carcinoma de células acínicas, el carcinoma de células claras ricas en glucógeno, el carcinoma sebáceo, el carcinoma inflamatorio y el carcinoma bilateral de mama.
- 10 2. Lesiones precursoras, tales como la neoplasia lobular (por ejemplo el carcinoma lobular *in situ*), las lesiones proliferativas intraductales (por ejemplo la hiperplasia ductal, la hiperplasia epitelial plana, la hiperplasia ductal atípica y el carcinoma ductal *in situ*), el carcinoma microinvasivo y los neoplasmas papilares intraductales (por ejemplo el papiloma central, el papiloma periférico, el papiloma atípico, el carcinoma papilar intraductal, el carcinoma papilar intraquístico y las lesiones epiteliales benignas),
- 15 3. Lesiones epiteliales benignas, tales como adenosis, incluyendo variantes (por ejemplo la adenosis esclerosante, la adenosis apocrina, la adenosis de conductos terminales, la adenosis microglandular y la adenosis adenomioepitelial), la lesión esclerosante de cicatriz radiada/compleja y los adenomas (por ejemplo el adenoma tubular, el adenoma lactante, el adenoma apocrino, el adenoma pleomórfico y el adenoma ductal),
- 20 4. Lesiones mioepiteliales tales como la mioepiteliosis, la adenosis adenomioepitelial, el adenomioepitelioma y el mioepitelioma maligno,
- 25 5. Tumores mesenquimales tales como el sarcoma, el hemangioma, la angiomasia, el hemangiopericitoma, la hiperplasia estromal pseudoangiomatosa, el miofibroblastoma, la fibromatosis (agresiva), el tumor miofibroblástico inflamatorio, el lipoma (por ejemplo el angiolipoma), el tumor de células granulares, el neurofibroma, el schwannoma, el angiosarcoma, el liposarcoma, el rabdomiosarcoma, el osteosarcoma, el leiomioma y el leiomiosarcoma.
- 30 6. Tumores fibroepiteliales tales como el fibroadenoma, el tumor filodes (por ejemplo benigno, límite y maligno), el sarcoma estromal periductal de grado bajo y el hamartoma mamario.
- 35 7. Tumores del pezón, tales como el adenoma de pezón, el adenoma siringomatoso y la enfermedad de Paget del pezón.
- 40 8. Linfoma maligno.
9. Tumores metastásicos, y
10. tumores de la mama masculina, tales como la ginecomastia y el carcinoma *in situ* o invasivo.

45 El carcinoma ductal es el tipo más común de cáncer de mama en mujeres y se refiere al desarrollo de células de cáncer dentro de los conductos galactóforos de la mama. Se presenta en dos formas: carcinoma ductal invasivo (CDI), un neoplasma maligno invasivo, y como carcinoma ductal *in situ* (CDIS), un neoplasma no invasivo. El CDI es la forma más común de cáncer de mama invasivo. Constituye aproximadamente 80% de todos los tipos de cáncer de mama. En la mamografía habitualmente aparece como una masa con ramas finas que radian desde los bordes. En el examen físico, este bulto habitualmente se percibe al tacto como mucho más duro o firme que las lesiones de

50 mama benignas. En el examen microscópico, las células cancerosas invaden y sustituyen los tejidos circundantes normales. El CDIS es el tipo más común de cáncer de mama no invasivo en mujeres. A medida que se ha generalizado la mamografía de cribado, el CDIS se ha convertido en una de las condiciones de la mama diagnosticadas con mayor frecuencia. Con frecuencia se denomina "estadio cero" del cáncer de mama. El CDIS habitualmente se detecta mediante un mamograma como puntos muy pequeños de calcio denominados microcalcificaciones. Sin embargo, no todas las microcalcificaciones indican la presencia de CDIS, la cual debe confirmarse mediante biopsia. El CDIS puede ser multifocal y el tratamiento se dirige a extirpar la totalidad de los elementos ductales anormales, dejando claros márgenes. Tras la extirpación, el tratamiento con frecuencia incluye radioterapia local. Con el tratamiento correcto, es improbable que el CDIS se desarrolle en cáncer invasivo. La extirpación quirúrgica con radiación reduce el riesgo de que el CDIS recurra o de que se desarrolle cáncer de mama

60 invasivo.

El carcinoma lobular invasivo (CLI) es un tipo de cáncer de mama que se inicia en un lóbulo y que se extiende al tejido mamario circundante. Si no se trata en un estadio precoz, el CLI puede extenderse a otras partes del cuerpo

tales como el útero o los ovarios. El CLI es el segundo tipo más común de cáncer de mama invasivo, constituyendo aproximadamente 10% a 15% de todos los casos de cáncer de mama. El CLI se caracteriza por un engrosamiento general de un área de la mama, habitualmente la sección situada sobre el pezón y hacia el brazo. Es menos probable que el CLI aparezca en un mamograma. Cuando sí aparece, puede visualizarse como una masa con ramas finas que radian desde los bordes o puede aparecer como una asimetría en comparación con la otra mama.

Terapias

Se han demostrado en el cáncer de mama varias alteraciones en componentes cruciales de la transducción de señales. Entre ellas se incluyen: mutaciones del RFCE que resultan en la activación; la activación de otros receptores de tirosina quinasa tales como cMet; la activación del RFCE con activación de HER-2 y HER-3 ó la amplificación de HER-2; la activación del RFCE con la mutación PI3K; la activación de RFCE con delección de PTEN, y la activación del RFCE con la mutación Ras. Diversas alteraciones de diferentes componentes de las rutas de transducción de señales han sido las dianas de diversas formas de quimioterapia.

Simultáneamente, puede ser una diana la formación de nuevos vasos sanguíneos hasta las células tumorales, un proceso denominado angiogénesis. El VFCE es un factor de supervivencia de las células endoteliales que resulta esencial para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por consiguiente, un enfoque para modular la angiogénesis mediada por el VFCE es la utilización de anticuerpos dirigidos contra la proteína VFCE misma o contra el RFCE. El bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante de VFCE, actúa sinérgicamente con la quimioterapia y se ha demostrado que mejora la supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal, de mama y de pulmón.

Todas las terapias endocrinas se han diseñado para bloquear la acción del receptor de estrógeno (RE) de un modo único. Por ejemplo, los moduladores selectivos de receptores estrogénicos (MSRE) tales como el tamoxifeno se unen al RE y bloquean parcialmente su actividad. La ablación ovárica, los agonistas de la hormona luteinizante liberadora de hormonas e inhibidores de la aromatasa tales como el anastrozol (Arimidex®), el letrozol (Femara®) y el exemestano (Aromasin®) reducen el nivel de estrógeno e inhiben la activación inducida por ligando del RE. Los MSRE deberían actuar como antiestrógeno en la mama y el útero y como agonista parcial de estrógeno en los sistemas esquelético, cardiovascular y nervioso central, así como en el tracto gastrointestinal y vagina.

Los antiestrógenos esteroideos tales como el fulvestrant se unen al RE más fuertemente, bloqueando por lo tanto de modo completo su acción e induciendo la degradación del receptor.

El tamoxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógeno (RE), es el fármaco más ampliamente utilizado para el tratamiento del cáncer de mama positivo para el RE. Los estudios de terapia adyuvante con tamoxifeno muestran una reducción de 40% a 50% en la probabilidad de recurrencia y en la mortalidad. El tamoxifeno proporciona además una remisión temporal en 30% a 50% de los pacientes con enfermedad metastásico y también resulta efectivo en la prevención del cáncer de mama.

Los inhibidores de aromatasa se están convirtiendo en el estándar de referencia para el tratamiento de mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama, mientras que el tamoxifeno sigue siendo el estándar para mujeres premenopáusicas. Aunque los inhibidores de aromatasa podrían resultar ligeramente más efectivos que el tamoxifeno, sigue siendo un fármaco importante por sus beneficios documentados en secuencia con dichos agentes para la terapia adyuvante y porque continuará presentando un papel para la enfermedad metastásica.

Resistencias

La resistencia *de novo* (falta de respuesta a la terapia inicial; resistencia primaria) y la resistencia adquirida (recaída de la enfermedad o progresión de la misma tras mostrar una respuesta inicial a la terapia; resistencia secundaria) al tamoxifeno son problemas importantes. En consecuencia, la comprensión de la biología tumoral y de los mecanismos de las resistencias podría presentar implicaciones clínicas significativas.

Biología de los receptores RE/RP: RE y RP son receptores de hormona nuclear que actúan como factores de transcripción en el núcleo cuando se encuentran unidos a uno o más ligandos. RE y PR presentan estructuras similares y contienen un dominio de unión a ADN, un dominio de dimerización, un dominio de unión a hormonas y varios dominios activadores de la transcripción. Se ha observado una mayor reducción del riesgo de recurrencia en pacientes con tumores positivos para RE y PR comparado con aquellos con tumores negativos para los mismos.

Acción del RE: la unión de hormonas al RE activa la proteína mediante fosforilación, disocia proteínas chaperonas tales como la proteína 90 de choque térmico, y altera su conformación. El RE con hormona unida ("activado") seguidamente se dimeriza con otro receptor, y el dímero se une a elementos de respuesta a estrógeno (secuencias de ADN específicas) presentes en el promotor de los genes sensibles al estrógeno. Los dímeros de RE unidos a un

promotor forman un complejo con proteínas correguladoras tales como la proteína amplificada 1 en el cáncer de mama (AIB1 ó SRC3), que actúa coordinadamente influyendo sobre la transcripción de los genes sensibles al estrógeno. Típicamente, se unen coactivadores al RE cuando el receptor se encuentra unido a estrógeno, mientras que se unen correpresores cuando el RE se encuentra unido a tamoxifeno. AIB1 se sobreexpresa en 65% de los cánceres de mama y el gen correspondiente se amplifica en el 5%. Los niveles elevados de AIB1 podrían contribuir a la resistencia a MSRE al incrementar la actividad de agonistas del estrógeno (por ejemplo el tratamiento con inhibidores de aromatasa). Los dímeros de RE también forman complejos con proteínas correpresoras tales como NCOR, regulando negativamente la expresión génica de determinados genes (por ejemplo HOXB13).

Varias quinasas presentes en las rutas de señalización de factores de crecimiento también pueden activar el RE en un proceso denominado activación independiente de ligando. Bajo determinadas condiciones, tales como una actividad elevada de la familia de ErbB (por ejemplo una actividad elevada de HER-2 ó de HER-1), el RE unido al tamoxifeno se acompleja con AIB1, resultando en una actividad incrementada de agonista de estrógeno del tamoxifeno (por ejemplo el tratamiento con fulvestrant o inhibidores de aromatasa conjuntamente con inhibidores de quinasa).

Dicha acción de RE no nuclear o señalización iniciada por esteroide en la membrana (SIEM) se produce en los minutos siguientes a la adición de estrógeno. Los MSRE tales como el tamoxifeno también pueden activar el RE membranar. Se han encontrado estos receptores en células óseas, neurales, uterinas, adiposas y endoteliales. Los mecanismos por los que el estrógeno activa la función del RE membranar se están empezando a clarificar. Se han observado interacciones directas entre el RE y una diversidad de moléculas de señalización en membrana tales como el receptor del factor 1 de crecimiento similar a insulina, la subunidad reguladora p85 de PI3K, Src y Shc, una proteína que puede acoplar directamente el RE a una diversidad de factores de crecimiento tirosina quinasa. La activación de dichas rutas por el estrógeno envía potentes señales de supervivencia y proliferación celulares mediante la activación de Akt y MAPK. Además, dichas quinasas pueden fosforilar el RE y sus correguladores para incrementar la señalización del RE nuclear. La fosforilación de estas proteínas puede incrementar además la actividad de tipo agonista de estrógeno del tamoxifeno y de otros MSRE.

El antiestrógeno puro fulvestrant no activa el RE membranar de esta manera; sin embargo, los MSRE tales como el tamoxifeno sí activan el RE membranar de una manera similar al estrógeno. Los efectos en membrana del RE, al igual que su actividad nuclear, pueden ser específicos de célula, de subtipo de receptor y de ligando, y también pueden verse influidos por el factor de crecimiento, siendo el entorno de señalización más prominente, por ejemplo, en cánceres de mama que sobreexpresan ErbB1 ó HER-2. La estimulación de la actividad MISS del RE por el tamoxifeno y otros MSRE puede explicar, en parte, la resistencia de estos agentes observada ocasionalmente en tumores que sobreexpresan HER-2.

Además de las funciones del RE asociadas al núcleo y a la membrana plasmática (señalización iniciada por esteroide en membrana, SIEM), el RE se conjuga con otras moléculas de la ruta para facilitar la posterior progresión tumoral. Esta intercomunicación molecular puede tratarse más efectivamente con inhibidores de aromatasa que con los MSRE.

El RE presenta por lo menos dos funciones principales. Sirve como factor de transcripción para los genes regulados por estrógeno y es un coactivador para otros factores de transcripción presentes en el núcleo. Funciona además en el citoplasma y en la membrana plasmática activando la señalización de factores de crecimiento. En algunos tumores mamarios, particularmente aquellos con rutas de señalización de factores de crecimiento muy activas, tales como la amplificación de HER-2, se establece un ciclo vicioso en el que el estrógeno activa la señalización de factor de crecimiento y la ruta de señalización de factores de crecimiento activa adicionalmente el RE. El estrógeno en dichos tumores se esperaría que fuese un factor dominante al activar múltiples rutas importantes en la progresión tumoral. Dicha intercomunicación molecular presenta importantes implicaciones para el tratamiento del cáncer de mama. A título de ejemplo, la terapia de privación de estrógeno con inhibidores de aromatasa debería resultar más efectiva que los MSRE en tumores con amplificación de HER-2 al cerrar la señalización de esteroide tanto iniciada en el núcleo como las actividades MISS del RE.

Enfermedad metastásica

Dos tercios o más de los tumores de mama dependen del estrógeno para su crecimiento. Pueden utilizarse varios agentes bloqueantes de estrógeno para el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Sin embargo, esta respuesta del tratamiento con estos agentes es impredecible y aproximadamente un tercio de los pacientes con cáncer de mama metastásico con receptores de estrógeno o de progesterona no obtienen ningún beneficio de la terapia hormonal. Prácticamente la totalidad de los pacientes con cáncer de mama metastásico finalmente adquirirán resistencia a la terapia hormonal aunque todavía se encuentren presentes los receptores hormonales.

La selección de la terapia se determina basándose en la activación de rutas de señalización o en una mejor comprensión de la biología tumoral. La presente invención proporciona ventajosamente una metodología de ensayo conjuntamente con un chip diagnóstico/pronóstico para ayudar a los oncólogos a decidir cuál es el mejor tratamiento para cada paciente.

5

V. Construcción de matrices de anticuerpos

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 soporte sólido en diferentes localizaciones direccionables.

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 (BiotransTM, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe[®], Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), la nitrocelulosa (Protran[®], Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) y PVDF (ImmobilonTM, Millipore Corp. (Billerica, MA)) resultan adecuadas para la utilización como soportes sólidos en las matrices de 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 comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Entre los aspectos particulares del soporte sólido que resultan deseables 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.

Los anticuerpos de captura típicamente 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, 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 BioRobotics (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 US nº 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 por lo menos aproximadamente 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 US nº 6.197.599, nº 6.777.239, nº 6.780.582, nº 6.897.073, nº 7.179.638 y nº 7.192.720; publicaciones de patente US nº 20060115810, nº 20060263837, nº 20060292680 y nº 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.

VI. Ensayos de detección individual

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, puede ser un ensayo de dos anticuerpos multiplex de proximidad de alto rendimiento que presenta un rango dinámico superior. A título de ejemplo no limitativo, los dos anticuerpos utilizados en el ensayo pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para el analito, y (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz de detectar, por ejemplo, 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, que detecta la cantidad total del 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 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,
- (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 un segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

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.

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

En una realización, los anticuerpos de detección pueden comprender un primer miembro de una pareja de unión (por ejemplo biotina) y el primer miembro de la pareja de amplificación de señales comprende un segundo miembro de la pareja de unión (por ejemplo estreptavidina). Los miembros de la pareja de unión pueden acoplarse directa o indirectamente a los anticuerpos de detección o con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales

utilizando métodos bien conocidos de la técnica. En determinados casos, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales es una peroxidasa (por ejemplo peroxidasa de rábano picante (PRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo-c peroxidasa, eosinófilo peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa tiroidea, desyodinasas, etc.) y el segundo miembro de la pareja de amplificación de señales es un reactivo tiramida (por ejemplo biotina-tiramida). En estos casos, la señal amplificada se genera mediante oxidación de peroxidasa del reactivo de tiramida para producir una tiramida activada en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

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 el presente método se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, un pigmento Alexa Fluor[®] (por ejemplo Alexa Fluor[®] 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), verde Oregon Green[™], rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), CyDye[™] flúor (por ejemplo Cy2, Cy3, Cy5) y similares. El marcaje de 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 el presente método 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.

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

En otra realización, la presente invención proporciona kits para llevar a cabo los ensayos de dos anticuerpos 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 kits pueden contener además cualquiera de los reactivos adicionales indicados anteriormente con respecto a la realización de los métodos específicos tales como, por ejemplo, primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales, reactivos de amplificación de señales de tiramida, tampones de lavado, etc.

En otra realización de un enfoque de dos anticuerpos, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de un receptor truncado, comprendiendo el método:

- (a) incubar un extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (DEC), en el que la región de unión a DEC es específica para un receptor de longitud completa,
- (b) separar la pluralidad de perlas del extracto celular, separando de esta manera los receptores de longitud completa para formar un extracto celular sin receptores de longitud completa,
- (c) incubar dicho extracto celular que no presente dichos receptores de longitud completa, con una pluralidad de anticuerpos de captura, en el que dicha pluralidad de anticuerpos de captura es específica de una región de unión a dominio intracelular (DIC) de dicho receptor truncado y en el que dicha pluralidad de anticuerpos capturados está inmovilizada sobre un soporte sólido para formar una pluralidad de receptores truncados capturados,
- (d) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección específicos para los receptores truncados correspondientes con el fin de formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables,
- (e) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un primer y segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
- (f) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales.

En determinadas realizaciones, el receptor truncado puede ser p95 ErbB2 y el receptor de longitud completa es ErbB2 (HER-2). En determinados otros aspectos, la pluralidad de perlas específica para una región de unión a dominio extracelular (DEC) comprende una pareja de estreptavidina-biotina, en la que la biotina se encuentra unida a una perla y la biotina se encuentra unida a un anticuerpo (por ejemplo en el que el anticuerpo es específico para la región de unión a DEC del receptor de longitud completa).

La figura 14A muestra que las perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular (DEC) de un receptor de interés se unen al receptor de longitud completa (por ejemplo ErbB2) pero no al receptor truncado (por ejemplo p95) para separar cualquier receptor de longitud completa del ensayo. La figura 14B muestra que el receptor truncado (por ejemplo p95), una vez unido a un anticuerpo de captura, seguidamente puede detectarse con un anticuerpo de detección que es específico para el dominio intracelular (DIC) del receptor de longitud completa (por ejemplo ErbB2). El anticuerpo de detección puede conjugarse directamente con peroxidasa de rábano picante

(PRP). A continuación puede llevarse a cabo la amplificación de señales de tiramida (AST) para generar una señal que debe detectarse. El estado de activación de p95 puede interrogarse a fin de determinar, por ejemplo, su estado de fosforilación, estado de ubiquitinación y/o estado de acomplejamiento.

5 VII. Ensayos de doble detección de proximidad

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, puede ser un ensayo multiplex de proximidad de alto rendimiento (es decir, de tres anticuerpos) que presenta un rango dinámico superior. A título de 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 actividad del analito (es decir, anticuerpo dependiente del estado de activación), y (3) un anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, 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.

En una realización preferente, el ensayo de proximidad comprende:

- (i) incubar el extracto celular con una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados,
- (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 dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes con el fin de formar una pluralidad de analitos capturados detectables, en el que los anticuerpos independientes de estado de activación se marcan 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 señales,
- (iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro de la pareja de amplificación de señal para generar una señal amplificada, y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señal.

Alternativamente, 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.

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.

Los anticuerpos de captura, anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación preferentemente se seleccionan para minimizar la competición entre ellos con respecto a la unión de analito (es decir, todos los anticuerpos pueden unirse simultáneamente a sus moléculas de transducción de señales correspondientes).

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), verde Oregon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetra rodamina (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.

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 adecuada para la utilización en la presente invención incluye cualquier molécula capaz de generar un agente oxidante que canaliza (es decir que se dirige a) y reacciona con (es decir, se une, es ligada por, 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 se incluyen, aunque sin limitación, enzimas tales como glucosa oxidasa o cualquier otro enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción que implica oxígeno molecular (O_2) como aceptor de electrones, y fotosensibilizadores tales como azul de metileno, rosa de Bengál, porfirinas, pigmentos escuarato, ftalocianinas y similares. Entre los ejemplos no limitativos de agentes oxidantes se incluyen el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 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), la fracción facilitadora (es decir, la glucosa oxidasa) genera un agente oxidante (por ejemplo peróxido de hidrógeno (H_2O_2), 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 determinados otros casos, 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 la 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 $1^\circ C$ y $10^\circ C$. 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 oligonucleótidas conectoras 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.

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.

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, peroxidasas tales como la peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, eosinófilo peroxidasa, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa del tiroides, deiodinasa, 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.

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 (PRP). Al poner en contacto la GO con un sustrato tal como glucosa, genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). En el caso de que la PRP se encuentre dentro de una proximidad canalizadora a la GO, el H_2O_2 generado por la GO será canalizado y acomplexado con la PRP, formando un complejo PRP- H_2O_2 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-hidroxifenil-acético) generará una señal amplificada. Los métodos de utilización de GO y PRP en un ensayo de proximidad se describen en, por ejemplo, Langry *et al.*, U.S. Dept. of Energy, informe nº 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- H_2O_2 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), verde 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.

En otro ejemplo de canalización de proximidad, la fracción facilitadora es un fotosensibilizador y el primer miembro de la pareja de amplificación de señales es una molécula grande marcada con múltiples haptenos que se encuentran protegidos con grupos protectores que evitan la unión de los haptenos a una pareja de unión específica (por ejemplo un ligando, anticuerpo, etc.). Por ejemplo, el miembro de la pareja de amplificación de señales puede ser una molécula de dextrano marcada con moléculas protegidas de biotina, coumarina y/o fluoresceína. Entre los grupos protectores adecuados se incluyen, aunque sin limitación, los grupos fenoxi, analino, olefina, tioéter y selenoéter. Se describen fotosensibilizadores adicionales y moléculas de hapteno protegidas adecuadas para la

utilización en ensayo de proximidad de la presente invención, en la patente US nº 5.807.675. Al excitar con luz el fotosensibilizador se genera un agente oxidante (por ejemplo oxígeno singlete). En el caso de que las moléculas de hapteno se encuentren dentro de la canalización por proximidad del fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza y reacciona con tioéteres en los grupos protectores de los haptenos, rindiendo grupos carbonilo (cetonas o aldehído) y ácido sulfínico, liberando los grupos protectores de los haptenos. Los haptenos no protegidos en este caso se encuentran disponibles para unirse específicamente al segundo miembro de la pareja de señalización de señales (por ejemplo una pareja de unión específica que puede generar una señal detectable). Por ejemplo, en el caso de que el hapteno sea biotina, la pareja de unión específica puede ser una estreptavidina marcada con enzima. Entre los enzimas ejemplares se incluyen fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, PRP, etc. Tras el lavado para eliminar los reactivos no unidos, la señal detectable puede generarse mediante la adición de un sustrato detectable (por ejemplo fluorescente, quimioluminiscente, cromogénico, etc.) del enzima y detectarse utilizando métodos adecuados e instrumentación conocida de la técnica. Alternativamente, la señal detectable puede amplificarse utilizando la amplificación de señales de tiramida y la tiramida activada detectarse directamente o detectarse tras la adición de un reactivo de detección de señales tal como se ha indicado anteriormente.

En todavía otro ejemplo de canalización por proximidad, la fracción facilitadora es un fotosensibilizador y el primer miembro de la pareja de amplificación de señales es un complejo de enzima-inhibidor. El enzima e inhibidor (por ejemplo dextrano marcado con ácido fosfónico) se unen entre sí con un conector cortable (por ejemplo tioéter). Al excitar el fotosensibilizador con luz, genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). En el caso de que el complejo de enzima-inhibidor se encuentre dentro de la canalización por proximidad al fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza y reacciona con el conector escindible, liberando el inhibidor del enzima, activando de esta manera el enzima. Se añade un sustrato enzimático para generar una señal detectable, o alternativamente, se añade un reactivo de amplificación para generar una señal amplificada.

En un ejemplo adicional de canalización por proximidad, la fracción facilitadora es PRP, el primer miembro de la pareja de amplificación de señales es un hapteno protegido o un complejo de enzima-inhibidor tal como se ha indicado anteriormente, y los grupos protectores comprenden p-alcoxi-fenol. La adición de fenilendiamina y H_2O_2 genera una fenilén-diiimina reactivo que se canaliza al hapteno protegido o al complejo de enzima-inhibidor y reacciona con los grupos protectores p-alcoxi-fenol, rindiendo haptenos expuestos o un enzima reactivo. La señal amplificada se genera y se detecta tal como se ha indicado anteriormente (ver, por ejemplo, las patentes US 5.532.138 y nº 5.445.944).

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

En otra realización, la presente invención proporciona 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, tampones de lavado, etc.

VIII. 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. 182, 1990; *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields, editor, Meth. Enzymol. 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 Laboratory Manual*, HarBajo y Lane, editores, Cold Spring Harbor Laboratory, 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 US nº 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 polipeptidos 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. Utilizando dichos métodos, seguidamente puede sintetizarse en masa por medios convencionales (ver, por ejemplo, la patente US nº 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 antiratón 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 del que 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, aunque 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 (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) de un polipéptido de interés y un adyuvante. 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 americana, 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 maleimidobenzil-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 R_1 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 mg (conejes) ó 5 mg (ratones) del antígeno o conjugado con 3 volúmenes de adyuvante 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 US nº 4.816.567).

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. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina 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, líquido ascites 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, para inducir la síntesis de anticuerpos monoclonales 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 la sustitución de las secuencias codificantes de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (ver, por ejemplo, la patente US nº 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.

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 US nº 4.816.567), en la que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente 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.

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 del roedor seguidamente se acepta como la región marco humana (FR) 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).

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 visualizaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la secuencia de región variable candidata para la unión 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.

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.

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; Bruggermann *et al.*, Year in Immun. 7:33, 1993, y patentes US nº 5.591.669, nº 5.589.369 y nº 5.545.807.

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 ó 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 diversos 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 US nº 5.565.332 y nº 5.573.905.

En determinados casos, los anticuerpos humanos pueden ser generados por células B activadas *in vitro*, tal como se describe en, por ejemplo, las patentes US nº 5.567.610 y nº 5.229.275.

E. Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, dichos fragmentos se han derivado 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 US nº 5.571.894 y nº 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal tal como se describe en, por ejemplo, la patente US 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 epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos 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 US 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 US 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 ditioles 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 triespecíficos. Ver, por ejemplo, Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60, 1991.

G. Purificación de anticuerpos

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.

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 $\gamma 1$, $\gamma 2$ ó $\gamma 4$ humanas (ver, por ejemplo, Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13, 1983). Se recomienda proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (ver, por ejemplo, Guss *et al.*, EMBO J. 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 ABXTM (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-SEPHAROSETM, la cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), el cromatoenfoco, SDS-PAGE y la precipitación con sulfato amónico, dependiendo del anticuerpo que debe recuperarse.

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 un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente llevada a cabo a concentraciones salinas bajas (por ejemplo de entre aproximadamente 0 y 0,25 M).

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, anticálms, ligandos de afinidad, filómeros, aptámeros, aficuerpos, trinectinas, y similares.

IX. Métodos de administración

Según los métodos de la presente invención, los fármacos anticáncer descritos en la presente memoria se administran 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 mamario) en un sujeto. Los métodos de la invención también pueden utilizarse para identificar la respuesta de un tumor (por ejemplo un tumor mamario) 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 mamario) 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.

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.

En algunas realizaciones, los fármacos anticáncer indicados en la presente memoria pueden coadministrarse 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 o ^{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 "coadministrarse" 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, y/o efectos terapéuticos, 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, pastillas, 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 eficaz 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 adyuvantes 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 eficaz puede encontrarse en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, gelatinas, 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 eficaz también puede proporcionarse en una forma liofilizada. Dichas formas de dosificación pueden incluir un tampón, por ejemplo bicarbonato, para la reconstitución previa a la administración, o el 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 el

30 tampón para la reconstitución, de manera que la forma de dosificación reconstituida pueda administrarse inmediatamente en un sujeto.

35 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

40 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.

45 En determinados aspectos, los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse conjuntamente con paneles de marcadores de expresión génica que predicen la probabilidad de pronóstico y/o recurrencia de cáncer de mama en diversas poblaciones de mujeres con, por ejemplo, enfermedad sin afectación ganglionar. Estos paneles génicos pueden resultar útiles para identificar mujeres que es improbable que experimentan recurrencia y, de esta manera, que es improbable que se beneficien de la quimioterapia adyuvante. Los paneles de expresión pueden utilizarse para identificar mujeres que pueden evitar con seguridad la quimioterapia adyuvante, sin afectar negativamente los resultados de periodo sin enfermedad y de supervivencia global. Entre los sistemas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Oncotype DXTM, que es un panel de 21 genes de Genomic Health, Inc.; MammaPrint[®], que es un panel de 70 genes de Agendia, y un panel de 76 genes de Veridex.

50 Además, en determinados otros aspectos, los métodos descritos en la presente memoria pueden utilizarse conjuntamente con paneles de marcadores de expresión génica que identifican los tumores originales para cánceres de tumor primario desconocido (TPD). Estos paneles génicos pueden resultar útiles para identificar mujeres con

55 cáncer metastásico que se beneficiarían de una terapia consistente con la administrada en mujeres diagnosticadas inicialmente con cáncer de mama. Entre los sistemas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el ensayo Aviara CancerTYPE ID, un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el sitio

primario de origen de 39 tipos tumorales, y el ensayo Pathwork® Tissue of Origin Test, que mide la expresión de más de 1.600 genes en una micromatriz y compara la "firma" de expresión génica de un tumor con la de 15 tipos de tejido conocidos.

5 X. Ejemplos

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 metastazado o micrometastazado a partir de un tumor sólido y entre ellas se incluyen las células tumorales circulantes (CTC), las células madre cancerosas (CMC) y/o las células que migran al tumor (por ejemplo las células progenitoras endoteliales circulantes (CPEC), las células endoteliales circulantes (CEC), 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 completa, suero, plasma, líquido de lavado ductal, líquido aspirado del pezón, linfa, orina, saliva, líquido aspirado con aguja fina, etc.). Las células circulantes pueden aislarse 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 remoción (ver, por ejemplo, Meye *et al.*, Int. J. Oncol. 21:521-530, 2002).

Aislamiento manual de las CTC:

Separación inmunomagnética de CTC. Aislamiento manual seguido de 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). Alternativamente pueden utilizarse anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos monoclonales.
- 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 ml de las Dynabeads prerrecubiertas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a una temperatura de entre 2°C y 8°C con balanceo y rotación suaves.
- 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 ml de tampón de estimulación.

Preparación de muestras:

- 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3 a 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 de control:

- 1) Se preparan controles de línea celular mediante la adición de pulsos de líneas celulares cancerosas humanas a células HL-60.
- 2) Se preparan controles de línea celular mediante la adición de pulsos de líneas celulares cancerosas humanas a sangre completa procedente de donantes sanos.

Aislamiento manual de CEC y CPEC:

A título de ejemplo no limitativo, las CEC y CPEC 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 CEC y CPEC. Aislamiento manual seguido de ensayo de activación:

- 5 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 ml de las Dynabeads prerrecubiertas a 1 ml de la muestra.
- 10 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a una temperatura de entre 2°C y 8°C con balanceo y rotación suaves.
- 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.
- 15 7) La muestra se resuspende en 100 ml de tampón de estimulación.

Preparación de muestras:

- 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3 a 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 de control:

- 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 preparan controles de línea celular mediante la adición de pulsos de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) a sangre completa donada por individuos sanos.

Aislamiento manual de CPEC (sin CEC):

- 30 Las CPEC 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 CPEC 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 (CPE) o las células madre hematopoyéticas primitivas (CMH) de las CPEC. Se han descrito diversos procedimientos de aislamiento de las CPEC 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.

Separación inmunomagnética de CPEC. Aislamiento manual seguido de ensayo de activación:

- 1) Se utilizan perlas magnéticas (Dynal M450 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 ml de las Dynabeads prerrecubiertas a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a una temperatura de entre 2°C y 8°C con balanceo y rotación suaves.
- 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 ml de tampón de estimulación.

Preparación de muestras:

- 1) Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3 a 5 ml se descartan para evitar la contaminación con células epiteliales 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 a 40 minutos a una temperatura de entre 18°C y 20°C.
- 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°C y 20°C.
- 9) Se separa

el sobrenadante y las células mononucleares de cada tubo se resuspenden en 1 ml de PBS.

Aislamiento celular de CTC, CEC y CPEC utilizando el sistema Veridex:

Veridex, LLC (Warren, NJ) ha comercializado el sistema CellSearch, que consiste del sistema CellTracks® AutoPrep®, el kit de células epiteliales CellSearch™ y el analizador CellTracks®. El sistema CellTracks® AutoPrep® 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 de: 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 tampones 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 CellTracks® AutoPrep®, puede proporcionar un método de aislamiento previo al análisis para la activación de rutas. El número de CTC puede ser informativo para el desarrollo de un algoritmo.

Sistema Veridex. Enriquecimiento en CTC seguido de recuento:

- 1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de 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 el 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 ensayo de activación:

- 1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de 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) La muestra se resuspende en 100 ml de tampón de estimulación.

Sistema Veridex. Enriquecimiento en CEC y CPEC seguido de ensayo de activación:

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

Preparación de muestras:

- 1) Recuento: Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en el tubo de conservación CellSave siguiendo las instrucciones del fabricante. Los primeros 3 a 5 ml se descartan para evitar la contaminación con células epiteliales o endoteliales liberadas de la vena punzada.
- 2) Análisis de la ruta: Se introduce sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contiene EDTA 1 mg/ml. Los primeros 3 a 5 ml se descartan para evitar la contaminación con células epiteliales o endoteliales liberadas de la vena punzada.

Aislamiento manual de las CMC:

Se acumulan las pruebas 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 414:105-11, 2001; Dontu *et al.*, Trends Endocrinol. Metab. 15:193-197, 2004; y Dick, Nature 423:231-233, 2003). Las células madre cancerosas (CMC) 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 CMC 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.

- 5 Separación inmunomagnética de CMC. Aislamiento manual seguido de ensayo de activación:
- 1) Se utilizan perlas magnéticas (Dynal AS, Oslo, Noruega). Estas perlas se recubren 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%.
 - 10 3) Se añaden $1 \cdot 10^7$ Dynabeads prerrecubiertas a 3 ml de la muestra.
 - 4) La mezcla se incuba durante 60 minutos a una temperatura de entre 2°C y 8°C con balanceo y rotación suaves.
 - 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.
 - 15 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 ml de tampón de estimulación.

Preparación de muestras:

- 20 1) Se obtienen especímenes de médula ósea de pacientes de cáncer mamario temprano tras obtener el consentimiento informado del paciente.
- 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
- 25 utilizando una centrífuga Beckman GS-6 a 4.000xg durante 35 minutos y se lava dos veces con PBS.

Estimulación y lisis celular de CMC aisladas:

Estimulación celular:

- 30 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:

- 35 1) La muestra se incuba con Herceptin, 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):

- 40 1) La muestra se incuba con Herceptin, lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces 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.

45 Las CMC estimuladas se lisan utilizando el protocolo siguiente:

- 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3.
- 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 ml de 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
- 50 perlas del lisado.
- 5) El lisado se transfiere a un tubo nuevo para el ensayo o almacenamiento a -80°C.

Tabla 3

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

Na 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
		Total (ml)	3,00
	Agua	Agua (ml)	7,00

Estimulación celular y lisis de CMC y/o CPEC aisladas:

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

Estimulación celular:

1) Se añaden los factores de crecimiento VFCE, FGF, PDGF, PIGF y/o Ang, cada uno a 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 avastina, Nexavar, Sutent y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de FCVE, FCF, FCDP, FCP y/o Ang, cada uno a 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 avastina, Nexavar, Sutent y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 minutos a 37°C.

2) A continuación, se estimulan las células mediante la adición de FCVE, FCF, FCDP, FCP y/o Ang, cada uno a 100 nM, y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células CEC y/o CPEC aisladas se lisan utilizando el protocolo siguiente:

1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3.

2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 ml de 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.

Estimulación y lisis celulares de CMC 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.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Herceptin, lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces 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 Herceptin, 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 CMC estimuladas se lisan aplicando el protocolo siguiente:

1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3.

- 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 ml de 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 US nº 5.728.541, nº 6.416.967, nº 6.887.680, nº 6.900.027, nº 6.933.129 y nº 7.112.415; y en las publicaciones de patente US nº 2004/0023375 y nº 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 a 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 a 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 a 10^6 /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 celulares en 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 Herceptin, 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 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 1) La muestra se incuba con Herceptin, 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 tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3, anteriormente.
- 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 ml de 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.

Aislamiento de células tumorales procedentes de especímenes de biopsia:

Aislamiento y cultivo celular:

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 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 a 20 minutos bajo agitación suave. Se eliminan los enzimas tras el tratamiento mediante lavado 3 veces con medio de cultivo celular.

5) La concentración celular se ajusta a 10^6 /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 procedentes de biopsias:

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 Herceptin, 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 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

1) La muestra se incuba con Herceptin, 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 tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3, anteriormente.

2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 ml de 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 Herceptin, 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 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 5 1) La muestra se incuba con Herceptin, 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.
- 10 Las células estimuladas se lisan aplicando el protocolo siguiente:
- 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos indicados en la Tabla 3, anteriormente.
 - 2) Tras el lavado final, las células se resuspenden sobre hielo en 100 ml de 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
 - 15 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.

- 20 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 dilución en serie de 2 veces.
 - 25 2) Tras secar durante la noche, el portaobjetos se bloqueó con tampón de bloqueo de Whatman.
 - 3) Se añadieron 80 ml 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 ml de anticuerpo de detección marcado con biotina (por ejemplo un anticuerpo monoclonal que reconozca p-RFCE o un anticuerpo monoclonal que reconozca RFCE con independencia del estado de activación) durante dos horas a temperatura ambiente.
 - 30 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 ml de biotina-tiramida a una concentración de 5 mg/ml y se hicieron reaccionar durante 15 minutos. El portaobjetos se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con
 - 35 DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.
 - 7) Se añadieron 80 ml 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).

40 Ejemplo 4. ELISA en micromatriz de doble detección de proximidad 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:

- 45 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 tampón de bloqueo de Whatman.
- 3) Se añadieron 80 ml 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.
- 50 4) Tras seis lavados con TBS-Tween, se añadieron 80 ml 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-RFCE que se conjugó directamente con glucosa oxidasa (GO), y (2) un anticuerpo monoclonal que reconoce el RFCE fosforilado que se conjugó directamente con peroxidasa de rábano picante (HRP). La incubación fue de dos horas a temperatura ambiente.
- 55 5) Alternativamente, en la etapa de detección se utilizó un conjugado con biotina del anticuerpo monoclonal que reconocía el RFCE 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-RFCE. Se utilizó el conjugado de HRP conjugado directamente o mediante unión con biotina-estreptavidina(SA) con el anticuerpo de RFCE fosforilado.
- 60 7) Para la amplificación de las señales, se añadieron 80 ml de biotina-tiramida a una concentración de 5 mg/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 ml 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.).

5 La figura 2 ilustra una realización de la presente invención en la que los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria detectaron RFCE fosforilado (RFCEp) y HER-2 fosforilado (pHER-2) con sensibilidad de células individuales.

10 La figura 3 muestra que los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria resultaron en ensayos altamente específicos para la detección de HER-2 al nivel de células individuales únicamente en células que expresaban HER-2.

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

15 Los métodos y composiciones 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 4).

20 Perfil de activación de referencia

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 mamario) 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. 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 2 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 RFCE indicada en la "Ruta 1" de la Tabla 2. Alternativamente, otro paciente podría presentar otro tipo de cáncer que mostrarse los estados de activación de la ruta de RFCE indicada en la "Ruta 2" de la Tabla 2. 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 cualesquier fármacos anticáncer.

40 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 mamario) 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 1) 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 RFCE se encuentra activado, las células pueden incubarse con uno o más de los fármacos listados en la columna "A" o "B" de la Tabla 1. 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.

60 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.

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

La figura 5 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/RFCE, ErbB3/HER-3 y ErbB4/HER-4 se homodimerizan y se heterodimerizan, activando varias rutas de señalización diferentes. ErbB2/HER-2 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 transfosforilación 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.

De esta manera, la matriz direccionable mostrada en la figura 5 permite no sólo determinar la expresión de la familia de ErbB de 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. Además, la expresión y/o estado de activación de receptores hormonales nucleares tales como RE (receptor de estrógenos) y RP (receptor de progesterona) y otras proteínas tales como CORN

(correpresor de receptor nuclear), AIB1 (amplificado en cáncer de mama-1), IGF-1R, cMET, Ki67 y TOPO II pueden estudiarse en el chip direccionable. Otra característica del chip es la presencia de controles internos para determinar el contenido tumoral o de células asociadas a tumor (CEC, CPE, pericitos, etc.) 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 figuras 6 y 7 ilustran la configuración de matrices direccionables 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 RFCE, FGFR y TIE de receptores de tirosina quinasa, que se expresan predominantemente sobre las células endoteliales. PDGFR típicamente se expresa sobre los pericitos. La expresión y estado de activación de estos receptores resultan críticos para determinar el mecanismo predominante de angiogénesis en especímenes tumorales individuales. Algunos factores de crecimiento como VFCE y PIGF se unen a RFCE-1 y RFCE-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, 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 las figuras 6 y 7, 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, CPE, pericitos, etc.) e IgG no específicas para determinar cualquier unión no específica.

Las figuras 8 y 9 muestran matrices direccionables combinadas que pueden utilizarse en la invención para determinar la expresión y/o estado de activación de la familia de ErbB de receptores de tirosina quinasa, así como los componentes de la transducción de señales que participan en la angiogénesis. Además, en estos chips direccionables combinados puede estudiarse la expresión y/o estado de activación de receptores de hormona nuclear tales como RE (receptor de estrógeno) y RP (receptor de progesterona) y otras proteínas tales como NCOR (correpresor de receptor nuclear), AIB1 (factor amplificado 1 en el cáncer de mama), IGF-IR, cMET, Ki67 y TOPO II. Otra característica de estos chips es la presencia de controles internos para determinar el contenido tumoral o de células asociadas a tumor (CEC, CPE, pericitos, etc.) e IgG no específicas para determinar cualquier unión no específica.

Ejemplo 8. Selección de pacientes para el tratamiento del cáncer de mama.

Un reto mayor del tratamiento del cáncer es la selección de regímenes terapéuticos que maximicen la eficacia y minimicen la toxicidad para un paciente dado. Un reto relacionado es la obtención de información diagnóstica, pronóstica y predictiva exacta.

En la actualidad, los tumores se clasifican generalmente en el sistema de tumor-ganglio-metástasis (TGM). Este sistema utiliza el tamaño del tumor, la presencia o ausencia de tumor en ganglios linfáticos regionales y la presencia o ausencia de metástasis distantes para asignar un estadio al tumor según las directrices publicadas en el manual de estadificación del cáncer de la AJCC (Lippincott, 5a edición, páginas 171 a 180, 1997). El estadio asignado se utiliza como base para la selección de la terapia apropiada y con fines pronósticos. Además de los parámetros de TNM, se utiliza la apariencia morfológica para clasificar adicionalmente los tumores en tipos tumorales y ayudar de esta manera a seleccionar la terapia apropiada. Sin embargo, este enfoque presenta serias limitaciones. Por ejemplo, los tumores que presentan una apariencia histopatológica similar pueden mostrar una variabilidad significativa en términos de curso clínico y respuesta a la terapia. Además, algunos tumores son de progresión rápida, mientras que otros, no. Además, algunos tumores responden fácilmente a la terapia hormonal o a la quimioterapia, mientras que otros son resistentes.

Los ensayos para marcadores de superficie celular, por ejemplo mediante inmunohistoquímica, han proporcionado medios para clasificar determinados tipos tumorales en subclases. Por ejemplo, un factor considerado en las decisiones pronósticas y de tratamiento para el cáncer de mama es la presencia o ausencia del receptor de estrógeno (RE) en las muestras tumorales. Los cánceres de mama positivos para el RE típicamente responden mucho más fácilmente a las terapias hormonales, tales como el tamoxifeno, que actúa como antiestrógeno en el tejido mamario, que los tumores negativos para el RE. Aunque útiles, estos análisis sólo predicen en parte el comportamiento clínico de los tumores de mama. Existe una diversidad fenotípica en los cánceres que las herramientas diagnósticas actuales no consiguen detectar. En consecuencia, todavía no se sabe con certeza cómo estratificar los pacientes entre los potenciales tratamientos para optimizar el resultado (por ejemplo para el cáncer de mama ver "NIH Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, 1-3 de nov., 2000", J. Nat. Cancer Inst. Monographs 30:5-15, 2001; y Di Leo *et al.*, Int. J. Clin. Oncol. 7:245-253, 2002).

La presente invención comprende la idea de que pueden utilizarse rutas de señalización para obtener una mejor comprensión de la etiología biológica del cáncer y la progresión de la enfermedad. La presente invención proporciona además métodos para el tratamiento de cánceres con diversas rutas de señalización activadas utilizando un régimen terapéutico personalizado.

En la actualidad se utilizan tres marcadores moleculares diferentes para definir cuatro subclases diferentes de cáncer de mama con implicaciones terapéuticas importantes. Los tres marcadores son RE, RP y HER-2/ErbB2. Las cuatro subclases principales son las siguientes:

1. RE+/RP+/ErbB2-
2. RE+/ErbB2+
3. RE-/ErbB2+
4. RE-/RP-/ErbB2

Una teoría actual divide el cáncer de mama en cinco subtipos moleculares: luminal A, luminal B, de tipo basal, positivo para HER-2/neu y similar a mama normal (ver, por ejemplo, Carey *et al.*, JAMA 295:2492-2502, 2006; Fan *et al.*, N. Engl. J. Med. 355:560-569, 2006; Hannemann *et al.*, British J. Cancer 95:1334-1341, 2006; Potemski *et al.*, Oncology 69:478-485, 2005). Mucho de lo que se conoce actualmente sobre estos subtipos se relaciona directamente con características que ya se entienden bien, tales como el estatus de receptor hormonal y de HER-2/neu.

El estrógeno desempeña un papel importante en la patogénesis del cáncer de mama y la interferencia selectiva en la cascada de señalización mediada por estrógeno/RE es el medio más efectivo para tratar los pacientes de cáncer de mama positivo para el RE. El RE regula el crecimiento y la diferenciación en células de mama tanto normales como malignas. La expresión de los receptores RE y/o de progesterona (RP) funcionales resulta esencial para que un tumor sea sensible a las terapias antihormonales ("sensible a hormonas") y múltiples estudios han demostrado que la expresión del RE es fuertemente predictivo de la respuesta a las terapias antihormonales, aunque su expresión es sólo débilmente pronóstica. El RE no actúa solo en la estimulación del crecimiento tumoral, sino que actúa una compleja red de interacciones que garantiza la viabilidad de las células cancerosas. La comprensión de esta red proporciona la base científica para la selección de las terapias dirigidas.

Los perfiles de paciente ejemplares mostrados posteriormente, en las Tablas 4 a 22, ilustran cómo un análisis de las rutas activas en las células tumorales circulantes (CTC) procedentes de sangre o de células de cáncer obtenidas de una biopsia con aguja pueden utilizarse para ayudar al médico a decidir un curso eficaz de tratamiento para un tumor mamario, por ejemplo el tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía para reducir el tamaño del tumor mamario o el tratamiento en pacientes con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico. En breve, los niveles de activación de diferentes componentes de las rutas de ErbB y de receptores de la hormona nuclear en las CTC o en células de cáncer derivadas de biopsia pueden determinarse en presencia o en ausencia de diferentes combinaciones de agentes terapéuticos de ensayo.

Tabla 4

Paciente 4001: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Elevada
Receptor de progesterona	Elevada		Intermedia
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil

Paciente 4001: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno
ErbB1	Bajo	Débil	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
PTEN	Intermedia	Intermedia	Intermedia
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Intermedia		Débil
TOPO II	Intermedia		Intermedia

El paciente (mujeres premenopáusicas y sin afectación ganglionar) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló un elevado nivel de expresión y activación de RE/RP. El paciente fue tratado con tamoxifeno. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. De esta manera, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde al tamoxifeno. Se cree que el RE atrae la proteína correpresora NCOR en presencia de antagonistas tales como el tamoxifeno, y se cree que esta atracción resulta esencial para una actividad antagonista completa.

Tabla 5

Paciente 4002: (RE+/RP-/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno + Quimioterapia
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Elevada
Receptor de progesterona	Bajo		Débil
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Débil	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil

Paciente 4002: (RE+/RP-/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno + Quimioterapia
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil
TOPO II	Elevada		Elevada

- 5 El paciente (mujeres premenopáusicas y sin afectación ganglionar) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló un elevado nivel de expresión de RE y una expresión elevada de Ki67. El paciente fue tratado con tamoxifeno + quimioterapia. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a tamoxifeno + quimioterapia. Se cree que el RE atrae la proteína correpresora NCOR en presencia de antagonistas tales como el tamoxifeno, y se cree que esta atracción resulta esencial para una actividad antagonista completa.
- 10

Tabla 6

Paciente 4003: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno + Quimioterapia
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Elevada
Receptor de progesterona	Elevada		Débil
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Débil	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil
TOPO II	Elevada		Elevada

- 5 El paciente (mujer premenopáusica con afectación ganglionar) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló un elevado nivel de expresión y activación de RE/RP. El paciente fue tratado con tamoxifeno + quimioterapia. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a tamoxifeno + quimioterapia. Se cree que el RE atrae la proteína correpresora NCOR en presencia de antagonistas tales como el tamoxifeno, y se cree que esta atracción resulta esencial para una actividad antagonista completa.

Tabla 7

Paciente 4004: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con inhibidor de aromatasa
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Elevada		Intermedia
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Intermedia		Débil
TOPO II	Bajo		

- 10 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló una expresión y activación elevadas de RE/RP conjuntamente con cierta activación de ErbB1 vía MISS (activación del RE en el citoplasma con activación cruzada resultante de ErbB1). El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa para eliminar toda actividad relacionada con el RE. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a los inhibidores de aromatasa.
- 15

Tabla 8

Paciente 4005: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con inhibidor de aromatasa + Quimioterapia
RE	Elevada	Intermedia	
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil

Paciente 4005: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con inhibidor de aromatasa + Quimioterapia
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Elevada		Intermedia
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil

ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil
TOPO II	Elevada		

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló una expresión y activación elevadas de RE/RP conjuntamente con cierta activación de ErbB1 vía MISS (activación del RE en el citoplasma con activación cruzada resultante de ErbB1). El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + quimioterapia para eliminar toda actividad relacionada con el RE. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a inhibidor de aromatasa + quimioterapia.

Tabla 9

Paciente 4006: (RE+/RP-/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con inhibidor de aromatasa O Tamoxifeno + Quimioterapia
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil

Paciente 4006: (RE+/RP-/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con inhibidor de aromatasa O Tamoxifeno + Quimioterapia
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló una expresión y activación elevadas de RE (tumores negativos para el RP) conjuntamente con cierta activación de ErbB1 vía MISS (activación del RE en el citoplasma con activación cruzada resultante de ErbB1). El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + quimioterapia para eliminar toda actividad relacionada con el RE. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a inhibidor de aromatasa + quimioterapia.

La Tabla 10 proporciona un ejemplo de un paciente con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico con recaída sometido a terapia endocrina y/o quimioterapia. Transcurren por lo menos 3 semanas desde que el paciente ha recibido quimioterapia adyuvante y terapia hormonal para cáncer de mama localmente recurrente o metastásico.

Tabla 10

Paciente 4007: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno o inhibidor de aromatasa + Taxano + Avastin®

RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Elevada		Intermedia
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil

Paciente 4007: (RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tamoxifeno o inhibidor de aromatasa + Taxano + Avastin®
Ki67	Elevada		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedia	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedia	Fuerte	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedia	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y de las células endoteliales reveló una expresión y activación elevadas de RE/RP conjuntamente con cierta activación de ErbB1 vía MISS (activación del RE en el citoplasma con activación cruzada resultante de ErbB1), así como la activación de RFCE2. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + quimioterapia + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con el RE y con RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + quimioterapia + Avastin®.

Tabla 11

Paciente 4008: (Elevada AIB1; ER+/PR+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Fulvestrant
RE	Elevada		Bajo
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		V. Elevada	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Débil
Receptor de progesterona	Elevada		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Débil	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil

ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil

Paciente 4008: (Elevada AIB1; RE+/RP+/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Fulvestrant
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil

- 5 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló una expresión y activación elevadas de RE/PR conjuntamente con una expresión muy elevada del complejo RE:AIB1. El paciente se trató con fulvestrant (Faslodex®) para degradar el RE. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde al fulvestrant.

10

Tabla 12

Paciente 4009: (ER+/PR-/ErbB2-)			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Aromatase Inhibitor + Quimioterapia
ER	Elevada		Intermedia
ER (Ser 118)		Elevada	Débil
ER (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Débil	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil

15

- El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE. El RP se expresaba a niveles muy bajos. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + quimioterapia para eliminar toda actividad relacionada con el RE. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a inhibidor de aromatasa + quimioterapia.

Tabla 13

Paciente 4010: (RE+/RP-/ErbB1+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib or Erbitux®
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de	Bajo		Bajo

progesterona			
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Débil	Débil
P70S6K		Débil	Débil
Ki67	Elevada		Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE. El RP se expresaba a niveles muy bajos. ErbB1 se encontraba activado. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + lapatinib o Erbitux® para eliminar toda actividad relacionada con RE/ErbB1. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + lapatinib o Erbitux®.

Tabla 14

Paciente 4011: (ER+/PR-/ErbB1+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib o Erbitux®
ER	Elevada		Intermedia
ER (Ser 118)		Elevada	Débil
ER (Ser 167)		Elevada	Débil
ER:AIB1			
Complex		Intermedia	Débil
ER:N-CoR			

Paciente 4011: (ER+/PR-/ErbB1+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib or Erbitux®
Complex		Débil	Intermedia
Progesterone			
Receptor	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Elevada	Elevada	Débil
ErbB2	Bajo	Débil	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Elevada	Débil
PI3K		Débil	Débil
Erk		Elevada	Débil
Rsk		Elevada	Débil
Akt		Débil	Débil
P70S6K		Débil	Débil
Ki67	Elevada		Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE. El RP se expresaba a niveles muy bajos. ErbB1 se encontraba activado. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + lapatinib o Erbitux® para eliminar toda actividad relacionada con RE/ErbB1. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + lapatinib o Erbitux®.

Tabla 15

Paciente 4012: (RE+/RP-/ErbB1+/ErbB2+)			
--	--	--	--

Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB2	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil

Paciente 4012: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib
PI3K		Intermedia	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE. El RP se expresaba a niveles muy bajos. ErbB1 y ErbB2 se encontraban activados. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa y lapatinib para eliminar toda actividad relacionada con RE/ErbB1/ErbB2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a inhibidor de aromatasa + lapatinib.

Tabla 16

Paciente 4013: (ER+/PR-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB2	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB3	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Intermedia	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE. El RP se expresaba a niveles muy bajos. ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se encontraban activados. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + lapatinib para eliminar toda actividad relacionada con RE/ErbB1/ErbB2/ErbB3. El paciente respondió y en la nueva

biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a inhibidor de aromatasa + lapatinib.

- 5 La Tabla 17 proporciona un ejemplo de un paciente con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico con recaída sometido a terapia antiangiogénica. Transcurrieron por lo menos 3 semanas desde que el paciente ha recibido quimioterapia adyuvante y terapia hormonal para cáncer de mama localmente recurrente o metastásico.

Tabla 17

Paciente 4014: (RE+/RP-/ErbB1+/ErbB2+/ErbB3+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib + Avastin®
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB2	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB3	Bajo	Intermedia	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Intermedia	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedia	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedia	Fuerte	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedia	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil

Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
P70S6K		Fuerte	Débil

- 10 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE conjuntamente con la activación de RFCE2. El RP se expresaba a niveles muy bajos. ErbB1, ErbB2 y ErbB3 se encontraban activados. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + lapatinib + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con RE + ErbB1, ErbB2, ErbB3 y RFCE2.
- 15 El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + lapatinib + Avastin®.

Tabla 18

Paciente 4015: (ER+/PR-/ErbB2-/IGF-1R+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Anti-IGF-1 R Ab

RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Elevada/Intermedia	Elevada	Débil
ErbB1	Bajo	Bajo	Débil
ErbB2	Bajo	Bajo	Débil
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Intermedia	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE. El RP se expresaba a niveles muy bajos. IGF-1R se encontraba activado. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + anticuerpos anti-IGF-1R para eliminar toda actividad relacionada con RE/IGF-1R. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a inhibidor de aromatasa + anticuerpos anti-IGF-1R.

Tabla 19

Paciente 4016: (ER+/PR+/ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Herceptin® + Avastin®
ER	Elevada		Intermedia
ER (Ser 118)		Elevada	Débil
ER (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Elevada		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Débil	Débil
ErbB2	Elevada	Elevada	Débil
P95 ErbB2	Bajo	Bajo	Bajo
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Intermedia	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedia	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedia	Fuerte	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedia	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil

Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE, RP y ErbB2 conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + Herceptin® + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con RE, ErbB2 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + Herceptin® + Avastin®.

5

10

Tabla 20

Paciente 4017: (RE+/PR+/REbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib + Avastin®
RE	Elevada		Intermedia
RE (SRE 118)		Elevada	Débil
RE (SRE 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Elevada		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
REbB1	Intermedia	Intermedia	Débil
REbB2	Elevada	Elevada	Débil
P95 REbB2	Intermedia	Elevada	Débil
REbB3	Bajo	Intermedia	Débil
REbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Elevada	Débil
REk		Elevada	Débil
Rsk		Elevada	Débil
Akt		Elevada	Débil
P70S6K		Elevada	Débil
Ki67	Elevada		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedia	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedia	Fuerte	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedia	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
REk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE, ErbB2 y ErbB2 p95 conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + lapatinib + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con RE + ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB2 p95 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + lapatinib + Avastin®.

15

20

Tabla 21

Paciente 4018: (ER+/PR-/ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Herceptin® + Taxanos + Avastin®
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia
Receptor de progesterona	Bajo		Bajo
IGF-1R	Bajo	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Débil	Débil
ErbB2	Elevada	Elevada	Débil
P95 ErbB2	Bajo	Bajo	Bajo
ErbB3	Bajo	Débil	Débil
ErbB4	Bajo	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Intermedia	Débil
Erk		Intermedia	Débil
Rsk		Intermedia	Débil
Akt		Intermedia	Débil
P70S6K		Intermedia	Débil
Ki67	Elevada		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedia	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedia	Fuerte	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedia	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil

Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

- 5 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE y ErbB2 conjuntamente con la activación de RFCE2. Los niveles de RP eran bajos. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + Herceptin® + taxanos + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con RE, ErbB2 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas
- 10 anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + Herceptin® + Avastin® + quimioterapia.

Tabla 22

Paciente 4019: (RE+/RP-/ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con AI + Lapatinib + Avastin® + Quimioterapia
RE	Elevada		Intermedia
RE (Ser 118)		Elevada	Débil
RE (Ser 167)		Elevada	Débil
Complejo RE:AIB1		Intermedia	Débil
Complejo RE:N-CoR		Débil	Intermedia

Receptor de progesterona	Baja		Bajo
IGF-1R	Baja	Débil	Débil
ErbB1	Intermedia	Intermedia	Débil
ErbB2	Elevada	Elevada	Débil
P95 ErbB2	Intermedia	Elevada	Débil
ErbB3	Baja	Intermedia	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
Shc		Intermedia	Débil
PI3K		Elevada	Débil
Erk		Elevada	Débil
Rsk		Elevada	Débil
Akt		Elevada	Débil
P70S6K		Elevada	Débil
Ki67	Elevada		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedia	Fuerte	Débil

Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV1	Intermedia	Fuerte	Débil
Tie 2	Bajo	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedia	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de RE, ErbB2 y ErbB2 p95 conjuntamente con la activación de RFCE2. El nivel de RP era bajo. El paciente se trató con un inhibidor de aromatasa + lapatinib + Avastin® + quimioterapia para eliminar toda actividad relacionada con RE + ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB2 p95 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor de aromatasa + lapatinib + Avastin® + quimioterapia.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en determinados aspectos, la presente invención permite la selección inteligente de marcadores de activación que predecirán óptimamente la supervivencia. Los marcadores de activación más apropiados pueden variar según los diferentes fármacos, y pueden utilizarse como guía para seleccionar entre la monoterapia con fármaco anticáncer y la terapia de combinación con un cóctel de fármacos anticáncer para proporcionar terapias dirigidas personalizadas.

Ejemplo 9. Selección de pacientes para el tratamiento del cáncer de mama positivo para Her2.

En los Estados Unidos aparecen aproximadamente 200.000 casos de cáncer de mama cada año. HER-2/ErbB2, un receptor membranal de tirosina quinasa de 185 kDa, se observa en 18% a 20% de los cánceres de mama y se ha asociado a una tasa incrementada de recaída y muerte. ErbB2 ahora es un marcador predictivo establecido de beneficio derivado de terapias tales como el trastuzumab (Herceptin®).

Durante la última década, se han realizado avances considerables en el tratamiento del cáncer de mama ErbB2+. La Herceptin® ha cambiado la historia natural de la enfermedad en los contextos metastásico y adyuvante. El lapatinib, ahora disponible comercialmente como Tykerb® (GlaxoSmithKline), es una adición importante y el primero de probablemente muchos agentes que se harán disponibles en el contexto futuro tras la Herceptin®.

Desafortunadamente, se desarrolla resistencia a Herceptin® en muchos casos, y en la práctica totalidad de los casos de metástasis. También se ha observado resistencia tanto *de novo* como adquirida a la Herceptin®.

Son posibles modos de resistencia a Herceptin®:

- Expresión alterada de diana (cambio en el estatus de ErbBs)
- Señalización por rutas alternativas (IGF-1R)
- Dimerización preferente con otros receptores (ErbB1 ó ErbB3)
- Administración subóptima de fármaco (la enfermedad metastásica del SNC en mujeres con cáncer de mama ErbB2 aparentemente resulta particularmente común). La incidencia de enfermedad metastásica en el SCN en pacientes con cáncer de mama metastásico ErbB2+ puede ser de hasta un tercio de los pacientes con enfermedad metastásica ErbB2+.
- Alteración de PTEN
- mutaciones de PI3K
- Expresión de ErbB2 P95 ó truncado de ErbB2
- Sobreexpresión o amplificación de cMET

Marcadores de selección/eficacia de la terapia:

- 5-FU/capecitabine: expresión de timidilato sintetasa (TS)
- expresión de dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD)
- las HDAC reducen la expresión de TS
- Taxanos: ErbB2
- Antraciclinas sobreexpresión de TOPO2
- positivo para ErbB2: (5-FU o taxanos o antraciclinas)

Se han sometido a ensayo múltiples regímenes de quimioterapia en combinación con Herceptin®. La combinación preferente es el tratamiento con paclitaxel, docetaxel, un taxano más una sal de platino, en el contexto metastásico. Todas las terapias dirigidas también pueden utilizarse en combinación.

Los perfiles de paciente ejemplares mostrados posteriormente, en las Tablas 23 a 25, ilustran cómo un análisis de las rutas activas en las células tumorales circulantes (CTC) procedentes de sangre o en células de cáncer obtenidas de biopsia pueden utilizarse para ayudar al médico a seleccionar los pacientes que podrían ser sensibles al trastuzumab (Herceptin®) y que por lo tanto se beneficiarían de dicha terapia para el tratamiento de un tumor mamario. Los perfiles de paciente ejemplares mostrados posteriormente, en las Tablas 26 a 31, ilustran cómo un análisis de las rutas activas en las CTC procedentes de sangre o en células de cáncer obtenidas de biopsia pueden utilizarse para ayudar al médico a seleccionar una terapia adecuada para los pacientes tras la recaída con Herceptin® resultante de la resistencia *de novo* o adquirida. En breve, los niveles de activación de diferentes componentes de las rutas de transducción de señales tales como las rutas de receptor de ErbB en las CTC o las células de cáncer derivadas de biopsia pueden determinarse en presencia o en ausencia de diferentes combinaciones de agentes terapéuticos de ensayo.

Tabla 23

Paciente 5001: (ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Herceptin® + Avastin® + Taxanos (Opcional)
IGF-1R	Baja	Débil	Débil
ErbB1	Intermedio	Débil	Débil
ErbB2	Alto	Alto	Débil
ErbB2 P95	Baja	Débil	Débil
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
Shc		Intermedio	Débil
PI3K		Intermedio	Débil
Erk		Intermedio	Débil
Rsk		Intermedio	Débil
Akt		Intermedio	Débil
P70S6K		Intermedio	Débil
Ki67	Alta		Débil
TOPO2	Baja		Débil
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedio	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedio	Intermedio	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil
Complejo de	Nula	Intermedio	Débil

cadherina V-R2			
----------------	--	--	--

Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB2 conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con Herceptin® + taxano + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con ErbB2 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a Herceptin® + Avastin® + quimioterapia.

Tabla 24

Paciente 5002: (ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Herceptin® + Avastin® + FEC: [fluorouracilo, epirrubicina (antraciclina) y ciclofosfamida]
IGF-1R	Baja	Débil	Débil
ErbB1	Intermedio	Débil	Débil
ErbB2	Alto	Alto	Débil
ErbB2 P95	Baja	Débil	Débil
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
Shc		Intermedio	Débil
PI3K		Intermedio	Débil
Erk		Intermedio	Débil
Rsk		Intermedio	Débil
Akt		Intermedio	Débil
P70S6K		Intermedio	Débil
Ki67	Alta		Débil
TOPO2	Alta		Alta
Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
RFCEV2	Intermedio	Fuerte	Débil
RFCEV1	Intermedio	Fuerte	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil

Células endoteliales:			
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con Avastin®
Complejo de cadherina V-R2	Nula	Intermedio	Débil
Shc		Fuerte	Débil
PI3K		Fuerte	Débil
Erk		Fuerte	Débil
Rsk		Fuerte	Débil
Akt		Fuerte	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB2 y TOPO2 conjuntamente con la activación de RFCE2. El

paciente se trató con Herceptin® + antraciclina + quimioterapia + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con ErbB2, RFCE2 y TOPO2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de Herceptin® + antraciclina + quimioterapia + Avastin®.

5

Tabla 25

Paciente 5003: (ErbB2+)				
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)		Tratamiento con Herceptin® + sorafinib o sunitib o AZD2171 + Taxanos (Opcional)
IGF-1R	Baja	Débil		Débil
ErbB1	Intermedio	Débil		Débil
ErbB2	Alta	Alta		Débil
P95 ErbB2	Baja	Débil		Débil
ErbB3	Baja	Intermedio		Débil
ErbB4	Baja	Débil		Débil
Shc		Intermedio		Débil
PI3K		Intermedio		Débil
Erk		Intermedio		Débil
Rsk		Intermedio		Débil
Akt		Intermedio		Débil
P70S6K		Intermedio		Débil
Ki67	Alta			Débil
TOPO2	Baja			Débil
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 ó sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Intermedio
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Alta	Débil	Alta
RFCDPb	Intermedio	Alta	Débil	High
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB2 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con Herceptin® + sorafinib + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con ErbB2, RFCDP y RFCE2. Debido a que PDGFR se encuentra sobreexpresado y activado en los pacientes resistentes a Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el PDGFR así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a Herceptin® + sorafinib + quimioterapia.

10

15

Tabla 26

Paciente 5004: (ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con lapatinib + taxanos+ sorafinib o sunitib o AZD2171
IGF-1R	Baja	Débil	Débil

ErbB1	Alta	Alta	Débil	
ErbB2	Alta	Alta	Débil	
P95 ErbB2	Baja	Débil	Débil	
ErbB3	Intermedio	Intermedio	Débil	
ErbB4	Baja	Débil	Débil	
Shc		Intermedio	Débil	
PI3K		Intermedio	Débil	
Erk		Intermedio	Débil	
Rsk		Intermedio	Débil	
Akt		Intermedio	Débil	
P70S6K		Intermedio	Débil	
Ki67	Alta		Débil	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación	Activación con AZD2171 ó sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Intermedio
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Alta	Débil	Alta
RFCDPb	Intermedio	Alta	Débil	Alta
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB1, ErbB2 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2.

- 5 El paciente se trató con lapatinib + sorafinib para eliminar toda actividad relacionada con ErbB1, ErbB2, PDGFR y RFCE2. Debido a que ErbB1 y PDGFR se encuentran sobreexpresado y activados en los pacientes resistentes a Herceptin® y Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el PDGFR así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. Se utilizó lapatinib en lugar de Herceptin® debido a que el lapatinib inhibe tanto ErbB1 como ErbB2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a lapatinib + sorafinib + quimioterapia.
- 10

Tabla 27

Paciente 5005: (ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Herceptin® + Taxanos + sorafinib o sunitib o AZD2171 + antic. anti-IGF-1R
IGF-1R	Alta	Alta	Débil
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil
ErbB2	Alta	Alta	Débil
P95 ErbB2	Baja	Débil	Débil
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
Shc		Intermedio	Débil
PI3K		Intermedio	Débil
Erk		Intermedio	Débil
Rsk		Intermedio	Débil
Akt		Intermedio	Débil
P70S6K		Intermedio	Débil

Ki67	Alta			Débil
TOPO2	Baja			Débil
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 ó sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Intermedio
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Alta	Débil	Alta
RFCDPb	Intermedio	Alta	Débil	Alta
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de IGF-1R, ErbB2 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2.

- 5 El paciente se trató con Herceptin® + sorafinib + Avastin® + anticuerpo (Ab) IGF-1R para eliminar toda actividad relacionada con IGF-1R, ErbB2, PDGFR y RFCE2. Debido a que IGF-1R y PDGFR se encuentran sobreexpresados y activados en los pacientes resistentes a Herceptin® y Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el PDGFR así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. Se utilizó Ab IGF-1R conjuntamente con Herceptin® en lugar de Herceptin® sola para inhibir tanto IGF-1R como ErbB2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a Herceptin® + Ab IGF-1R sorafinib + quimioterapia.

Tabla 28

Paciente 5006: (ErbB2+/delección de PTEN)				
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con lapatinib + taxanos + sorafinib o sunitib o AZD2171 + rapamicina	
IGF-1R	Baja	Baja	Débil	
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Intermedio	
ErbB2	Alta	Alta	Débil	
P95 ErbB2	Intermedio	Alta	Débil	
ErbB3	Baja	Intermedio	Intermedio	
ErbB4	Baja	Débil	Débil	
PTEN	Baja	Baja	Baja	
Shc		Intermedio	Débil	
PI3K		Intermedio	Intermedio	
Erk		Intermedio	Débil	
Rsk		Intermedio	Débil	
Akt		Intermedio	Alta	
P70S6K		Intermedio	Débil	
Ki67	Alta		Débil	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 ó sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil

RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Intermedio
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Alta	Débil	Alta
RFCDPb	Intermedio	Alta	Débil	Alta
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

- 5 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB2 p95, ErbB2 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente presentaba además una delección de PTEN. El paciente se trató con lapatinib + sorafinib para eliminar toda actividad relacionada con ErbB2, PDGFR y RFCE2. Debido a que ErbB2 p95 y PDGFR se encuentran sobreexpresados y activados en los pacientes resistentes a Herceptin® y Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el PDGFR así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. Se utilizó lapatinib en lugar de Herceptin® para inhibir tanto ErbB2 p95 como ErbB2 y se utilizó el inhibidor mTor para eliminar la actividad de señalización posterior. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a lapatinib + sorafinib + rapamicina + quimioterapia.

Tabla 29

Paciente 5007: (ErbB2+/ErbB2 p95+)				
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Lapatinib + Taxanes + Sorafinib or Sunitinib or AZD2171	
IGF-1R	Baja	Baja	Débil	
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil	
ErbB2	Alta	Alta	Débil	
P95 ErbB2	Alta	Alta	Débil	
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil	
ErbB4	Baja	Débil	Débil	
Shc		Intermedio	Débil	
PI3K		Intermedio	Débil	
Erk		Intermedio	Débil	
Rsk		Intermedio	Débil	
Akt		Alta	Débil	
P70S6K		Intermedio	Débil	
Ki67	Alta		Débil	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 o sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Intermedio
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Alta	Débil	Alta
RFCDPb	Intermedio	Alta	Débil	Alta
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB2 p95, ErbB2 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con lapatinib + sorafinib para eliminar toda actividad relacionada con ErbB2, PDGFR y RFCE2. Debido a que ErbB2 p95 y PDGFR se encuentran sobreexpresados y activados en los pacientes resistentes a Herceptin® y Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el PDGFR así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. Se utilizó lapatinib en lugar de Herceptin® para inhibir tanto ErbB2 p95 como ErbB2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a lapatinib + sorafinib + quimioterapia.

Tabla 30

Paciente 5008: (ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con lapatinib + taxanos+ sorafinib o sunitib o AZD2171
IGF-1R	Baja	Baja	Débil
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil
ErbB2	Alta	Alta	Débil
P95 ErbB2	Baja	Débil	Débil
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
Shc		Intermedio	Débil
PI3K		Intermedio	Débil
Erk		Intermedio	Débil
Rsk		Intermedio	Débil
Akt		Intermedio	Débil
P70S6K		Intermedio	Débil
Ki67	Alta		Débil
TOPO2	Baja		Débil

Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 o sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Intermedio
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Alta	Débil	Alta
RFCDPb	Intermedio	Alta	Débil	Alta
Shc		Fuerte	Débil	Débil
PI3K		Fuerte	Débil	Débil
Erk		Fuerte	Débil	Débil
Rsk		Fuerte	Débil	Débil
Akt		Fuerte	Débil	Débil
P70S6K		Fuerte	Débil	Débil

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB2 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente presentaba metástasis cerebrales. El paciente se trató con lapatinib + sorafinib para eliminar toda actividad relacionada con ErbB2, RFCDP y RFCE2. Debido a que RFCDP se encuentra sobreexpresado y activado en los pacientes resistentes a Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el PDGFR así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. Se utilizó lapatinib en lugar de Herceptin® debido a que el paciente presentaba metástasis cerebrales. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a lapatinib + sorafinib + quimioterapia.

Tabla 31

Paciente 5009: (ErbB2+)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Herceptin® + taxanos + Avastin® + lapatinib
IGF-1R	Baja	Débil	Débil
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil
ErbB2	Alta	Alta	Débil
P95 ErbB2	Intermedio	Intermedio	Débil
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
Shc		Intermedio	Débil
PI3K		Intermedio	Débil
Erk		Intermedio	Débil
Rsk		Intermedio	Débil
Akt		Intermedio	Débil
P70S6K		Intermedio	Débil
Ki67	Alta		Débil

Paciente 5009: (ErbB2+)				
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Herceptin® + taxanos + Avastin® + lapatinib	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 ó sorafinib o Sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Baja	Débil	Débil
RFCDPb	Intermedio	Baja	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

- 5 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados niveles de expresión y activación de ErbB1, ErbB2, ErbB3 y PDGFR conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con Herceptin® + lapatinib + sorafinib para eliminar toda actividad relacionada con ErbB1, ErbB2, ErbB3, PDGFR y RFCE2. Debido a que ErbB1 y RFCDP se encuentran sobreexpresados y activados en los pacientes resistentes a Herceptin® y Avastin®, información tal como la presentada anteriormente indica que
- 10 AZD2171 ó sorafinib, que inhibe el RFCDP así como el RFCE, podrían ser agentes de elección para tratar dichos tumores. Se utilizó lapatinib en lugar de Herceptin® para inhibir ErbB1, ErbB2 y ErbB3. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a lapatinib + Herceptin® + sorafinib + quimioterapia.
- 15 Ejemplo 10. Selección de pacientes para el tratamiento del cáncer de mama ER-, PR- y negativo para ErbB2.

- Aproximadamente 15-20% de las mujeres con cáncer de mama presenta el tipo triple negativo de cáncer. Los pacientes con "cáncer de mama triple negativo" presenta una ausencia completa de los receptores de hormona RE, RP y HER-2/ErbB2, con un curso clínico agresivo y pocas opciones de tratamiento. La única opción terapéutica es la quimioterapia y a este respecto la elección de agentes citostáticos es limitada. El tratamiento estándar para el cáncer de mama triple negativo típicamente es una combinación de quimioterapia, cirugía y/o terapia de radiación. Al

tratarla con terapia estándar, las mujeres con cáncer de mama triple negativo presentan un pronóstico a largo plazo peor que las mujeres con cáncer de mama que no es triple negativo. Las células de cáncer de mama triple negativo habitualmente presentan expresión de ErbB1 sobre su superficie celular. Las mujeres con cáncer de mama positivo para ErbB1 presentan un pronóstico a largo plazo peor que las mujeres cuyos tumores no expresan ErbB1. Existe una necesidad en la técnica de métodos para el perfilado, selección y predicción de opciones de tratamiento para los pacientes con cáncer de mama triple negativo.

Tabla 32

Paciente 6001: (triple negativo con niveles Bajas de ErbB1)				
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con taxanos + Avastin®	
RE	Baja			
RP	Baja			
IGF-1R	Baja	Débil	Débil	
ErbB1	Baja	Débil	Débil	
ErbB2	Baja	Débil	Débil	
P95 ErbB2	Baja	Débil	Débil	
ErbB3	Baja	Débil	Débil	
ErbB4	Baja	Débil	Débil	
Shc		Intermedio	Débil	
PI3K		Intermedio	Débil	
Erk		Intermedio	Débil	
Rsk		Intermedio	Débil	
Akt		Intermedio	Débil	
P70S6K		Intermedio	Débil	
Ki67	Alta		Débil	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 ó sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Baja	Débil	Débil
RFCDPb	Intermedio	Baja	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 El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló niveles bajos de expresión y activación nula de RE, ErbB2 y ErbB2 p95 conjuntamente con la activación de únicamente RFCEV2. El paciente se trató con taxanos + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. De esta manera, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a Avastin® + quimioterapia.
- 15

Tabla 33

Paciente 6002: (triple negativo)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con Tarceva® + taxanos + Avastin®
RE	Baja		
RP	Baja		

IGF-1R	Baja	Débil	Débil	
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil	
ErbB2	Baja	Débil	Débil	
P95 ErbB2	Baja	Débil	Débil	
ErbB3	Baja	Débil	Débil	
ErbB4	Baja	Débil	Débil	
Shc		Intermedio	Débil	
PI3K		Intermedio	Débil	
Erk		Intermedio	Débil	
Rsk		Intermedio	Débil	
Akt		Intermedio	Débil	
P70S6K		Intermedio	Débil	
Ki67	Alta		Débil	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 o sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
PDGFRa	Intermedio	Baja	Débil	Débil
PDGFRb	Intermedio	Baja	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

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y células endoteliales reveló elevados intermedios de expresión y activación de ErbB1 y la activación de RFCE2. El paciente se trató con Tarceva® + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con ErbB1 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a Tarceva® + Avastin® + quimioterapia.

5

Tabla 34

Paciente 6003: (triple negativo)			
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (Nivel de fosforilación)	Tratamiento con inhibidor pan-Her + taxanos + Avastin®
RE	Baja		
RP	Baja		
IGF-1R	Baja	Débil	Débil
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil
ErbB2	Baja	Intermedio	Débil
P95 ErbB2	Nulo	Débil	Débil
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil
ErbB4	Baja	Débil	Débil
PTEN	Intermedio		
Shc		Intermedio	Débil
PI3K		Intermedio	Débil
Erk		Intermedio	Débil
Rsk		Intermedio	Débil
Akt		Intermedio	Débil
P70S6K		Intermedio	Débil
Ki67	Alta		Débil

TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 o sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Baja	Débil	Débil
RFCDPb	Intermedio	Baja	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

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y las células endoteliales reveló niveles intermedios de expresión y activación de ErbB1, ErbB2 y ErbB3, conjuntamente con la activación de RFCE2. El paciente se trató con un inhibidor pan-HER + Avastin® para eliminar toda actividad relacionada con ErbB1, ErbB2 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor pan-HER + Avastin® + quimioterapia. Entre los ejemplos de inhibidores pan-HER se incluyen, aunque sin limitación, BMS-599626 y CI-1033.

Tabla 35

Paciente 6004: (triple negativo)				
Receptor	Expresión	Activación (+/-GF) (nivel de fosforilación)	Tratamiento con Inhibidor pan-Her + taxanos + Avastin® + rapamicina	
RE	Baja			
RP	Baja			
IGF-1R	Baja	Débil	Débil	
ErbB1	Intermedio	Intermedio	Débil	
ErbB2	Baja	Intermedio	Débil	
P95 ErbB2	Nulo	Nulo	Nulo	
ErbB3	Baja	Intermedio	Débil	
ErbB4	Baja	Débil	Débil	
PTEN	Nulo			
Shc		Intermedio	Débil	
PI3K		Intermedio	Débil	
Erk		Intermedio	Débil	
Rsk		Intermedio	Débil	
Akt		Intermedio	Débil	
P70S6K		Intermedio	Débil	
Ki67	Alta		Débil	
TOPO2	Baja		Débil	
Células endoteliales y pericitos:				
Receptor	Expresión	Activación (nivel de fosforilación)	Activación con AZD2171 o sorafinib o sunitinib	Activación con Avastin®
RFCE2	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
RFCE1	Intermedio	Fuerte	Débil	Débil
Tie 2	Baja	Débil	Débil	Débil
Complejo de cadherina V-R2	Nulo	Intermedio	Débil	Débil
RFCDPa	Intermedio	Baja	Débil	Débil
RFCDPb	Intermedio	Baja	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

El paciente (mujer premenopáusica o postmenopáusica) con cáncer de mama localmente recurrente o metastásico se biopsió o se aislaron CTC a partir de sangre. El análisis de las células tumorales y las células endoteliales reveló niveles intermedios de expresión y activación de ErbB1, ErbB2 y ErbB3, conjuntamente con la activación de RFCE2. PTEN se encontraba delecionado. El paciente se trató con un inhibidor pan-HER + Avastin® + inhibidor de mTOR para eliminar toda actividad relacionada con ErbB1, ErbB2, ErbB3 y RFCE2. El paciente respondió y en la nueva biopsia presentaba el perfil de proteínas mostrado anteriormente. Por lo tanto, un paciente con el perfil de proteínas anteriormente indicado responde a la combinación de inhibidor pan-HER + Avastin® + rapamicina + quimioterapia.

Ejemplo 11. El seguimiento de los pacientes de cáncer de mama para la activación de RFCE y/o HER-2 guía la selección del tratamiento

Se examinaron cinco pacientes de cáncer de mama sometidos a terapia para el número de células tumorales circulantes (CTC), la expresión de RFCE sobre las CTC mediante tinción y la fosforilación de RFCE y HER-2 (ErbB2) utilizando los ensayos de proximidad descritos en la presente memoria. En las Tablas 36, 37 y 38 se muestran los datos de demografía de los pacientes, historia de cáncer y medicación actual, respectivamente. Los resultados de los ensayos con tumor primario para receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) y HER-2 se proporcionan en la Tabla 39. Las Tablas 40 y 41 muestran el número de CTC detectado en cada muestra y los niveles de fosforilación relativos de RFCE y HER-2. Se calcularon los niveles de fosforilación relativos utilizando la media de 4 controles con tampón. Los datos de fosforilación también se proporcionan en forma de gráfico en las figuras 10 y 11. La figura 12 muestra imágenes de tinción de CTC para RFCE, citoqueratina (CK) y citoqueratina con DAPI. Los controles de línea celular eran SKBr3 y A431, que eran positivos para la expresión de HER-2 y RFCE, respectivamente. Se procesó sangre completa procedente de 6 individuos normales utilizando el mismo protocolo a modo de controles. Ninguna de las muestras normales mostraba fosforilación de RFCE o HER-2 a niveles superiores al nivel de fondo.

Tabla 36

Datos demográficos de los 5 pacientes con cáncer de mama en el estudio.			
Número de paciente	Fecha de nacimiento	Sexo	Raza/Etnicidad
01-003	01/APR/1951	Mujer	Hispano/Latino
01-006	15/OCT/1929	Mujer	Asiático
01-014	29/SEP/1966	Mujer	Hispano/Latino
01-019	08/JUN/1954	Mujer	Asiático
02-017	03/OCT/1954	Mujer	Caucásico

Tabla 37

Historia de cáncer de los 5 pacientes con cáncer de mama en el estudio.					
Paciente Número	Tipo de cáncer	Estadio	Sitio de metástasis	Comprobación de si es actual	Tipo de tratamiento
01-003	MAMA	3C	GANGLIOS LINFÁTICOS PARED TORÁCICA IZQUIERDA	Comprobado	QUIMIOTERAPIA
01-006	MAMA	4	GANGLIOS LINFÁTICOS E HÍGADO	Comprobado	QUIMIOTERAPIA
01-014	MAMA	4	GANGLIOS LINFÁTICOS	Comprobado	QUIMIOTERAPIA
01-019	MAMA	4	HUESO HÍGADO	Comprobado	QUIMIOTERAPIA
02-017	MAMA	3	GANGLIOS LINFÁTICOS	No comprobado	RADIACIÓN QUIMIOTERAPIA

Tabla 38

Medicación actual de los 5 pacientes con cáncer de mama en el estudio.			
Número de	Nombre del	Diagnóstico asociado al tratamiento	Dosis

paciente	fármaco		
01-003	BENADRYL	MEDICACIÓN PRE-QUIMIO	25 MG CADA 28 DÍAS
01-003	DECADRON	MEDICACIÓN PRE-QUIMIO	20 MG CADA 28 DÍAS
01-003	HERCEPTIN	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	8 MG CADA 28 DÍAS
01-003	TAGAMET	PRE-QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	300 MG CADA 28 DÍAS
01-003	TAXOTERE	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	40 MG CADA 28 DÍAS
01-003	TYLENOL	DOLOR	1 G CADA 28 DÍAS

Medicación actual de los 5 pacientes con cáncer de mama en el estudio.			
Número de paciente	Nombre del fármaco	Diagnóstico asociado al tratamiento	Dosis
01-003	ZOFRAN	PRE-QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	32 MG CADA 28 DÍAS
01-006	DECADRON	PRE-MED PARA QUIMIO	20 MG CADA 2 SEMANAS
01-006	GEMZAR	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	1000 MG CADA 2 SEMANAS
01-006	HERCEPTIN	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	100 MG CADA SEMANAS
01-006	KYTRIL	PRE-MED PARA QUIMIO	1 MG CADA 2 SEMANAS
01-006	TYLENOL	PRE MED	1 G CADA 2 SEMANAS
01-014	CARBOPLATINO	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	650 MG CADA 21 DÍAS
01-014	DECADRON	PRE-MED PARA QUIMIO	20 MG CADA 21 DÍAS
01-014	HERCEPTIN	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	270 MG CADA 21 DÍAS
01-014	ROCEPHIN	ANTIBIÓTICO PARA FIEBRE	1000 MG PRN
01-014	TAXOTERE	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	100 MG CADA 21 DÍAS
01-014	ZOFRAN	PRE-MED PARA QUIMIO	32 MG CADA 21 DÍAS
01-019	ARELIA	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	90 MG CADA 21 DÍAS
01-019	BENADRYL	PRE-MED PARA QUIMIO	25 MG CADA 21 DÍAS
01-019	CARBOPLATINO	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	580 MG CADA 21 DÍAS
01-019	DECADRON	PRE-MED PARA QUIMIO	20 MG CADA 21 DÍAS
01-019	KYTRIL	PRE-MED PARA QUIMIO	1 MG CADA 21 DÍAS
01-019	MORFINA SULFATO	PRE-QUIMIO	2 MG PRN
01-019	TAGAMET	PRE-MED PARA QUIMIO	300 MG CADA 21 DÍAS
01-019	TAXOTERE	QUIMIO PARA CÁNCER DE MAMA	110 MG CADA 21 DÍAS
01-019	ZOCOR	HIPERCOLESTEROLEMIA	10 MG AL DÍA
02-017	ADRIAMICINA	CÁNCER DE MAMA	79 MG CADA 21 DÍAS
02-017	BENADRYL	PRURITO	25 MG CADA 21 DÍAS
02-017	CYTOXEN	CÁNCER DE MAMA	790 MG CADA 21 DÍAS
02-017	DECADRON	NÁUSEA	20 MG CADA 21 DÍAS
02-017	VICODIN	DOLOR DEL CÁNCER	325 MG TID PRN
02-017	ZOFRAN	NÁUSEA Y VÓMITOS	32 MG CADA 21 DÍAS

Tabla 39

Resultados del ensayo diagnóstico de RE, RP y HER-2 para los 5 pacientes con cáncer de mama en el estudio.			
Número de paciente	El sujeto ¿es positivo para RE?	El sujeto ¿es positivo para RP?	El sujeto ¿es positivo para HER2?
01-003	No	No	Sí
01-006	No	No	Desconocido
01-014	No	No	Sí
01-019	Sí	No	No
02-017	No	No	No

5

Tabla 40

Número de CTC (por cada 7,5 ml) y niveles relativos de fosforilación de RFCE para 5 muestras de cáncer de mama y 6 muestras normales.		
	Cáncer de mama	Normal

nº de serie	ID de paciente	CTC	Nivel relativo de RFCE	ID de paciente	CTC	Nivel relativo de RFCE
1	01-014	3	0,7	02-007	0	1,14
2	01-003	1	1,26	01-013	0	1,31
3	01-019	4	0,88	01-011	0	1,2
4	01-006	1	3,27	01-015	1	0,68
5	02-017	3	2,44	02-012	0	1,32
6				02-013	0	0,68

Table 41

Número de CTC (por cada 7,5 ml) y niveles relativos de fosforilación de HER-2 para 5 muestras de cáncer de mama y 6 muestras normales.						
Cáncer de mama				Normal		
nº de serie	ID de paciente	CTC	Nivel relativo de HER-2	ID de paciente	CTC	Nivel relativo de HER-2
1	01-014	3	0.66	02-007	0	1.13
2	01-003	1	1	01-013	0	1.15
3	01-019	4	0.94	01-011	0	1.31
4	01-006	1	2.52	01-015	1	0.76
5	02-017	3	2.14	02-012	0	1.07
6				02-013	0	0.59

El paciente 01-019 mostró un resultado positivo para RE y negativo para RP y la sobreexpresión de HER-2 en el tumor primario. Este paciente no recibió Herceptin® y se estaba sometiendo a tratamiento con Taxotere® + carboplatino en el momento de la extracción de sangre. Se identificaron cuatro CTC. Ninguna de estas células mostró tinción positiva para la expresión de RFCE en el sistema Veridex CellSearch™. Tras la estimulación de las CTC aisladas con ligando, no se produjo fosforilación detectable de RFCE o HER-2 en los ensayos de proximidad. Estos datos informan al médico de que las células tumorales del paciente continúan no estando controladas por rutas de RFCE/HER-2, por lo que no hay motivo para modificar la terapia actual.

No se proporcionan datos para el ensayo de HER-2 para el paciente 01-006, pero presumiblemente proporcionó un resultado positivo para HER-2 ya que recibía terapia de Herceptin®. El paciente mostró un resultado negativo tanto para RE como para RP. El paciente 01-006 presentaba 1 CTC que era positiva para la expresión de RFCE según tinción. Se detectó una activación significativa tanto de RFCE como de HER-2. A pesar de la terapia que incluía Herceptin®, no se cerró la ruta de RFCE ni la de HER-2. La activación podría resultar de la formación de heterodímeros entre EGFR y HER-2, permitiendo evadirse de la inhibición por Herceptin®. Estos datos informan al médico de que debe modificarse la terapia. Estarían indicadas terapias que incluyen agentes con diana tanto en RFCE como en HER-2, tales como lapatinib, Herceptin® + ZACTIMA™, Herceptin® + Erbitux®, Herceptin® + Iressa®, o Herceptin® + Tarceva®.

El paciente 02-017 mostró un resultado negativo para RE, RP y sobreexpresión de HER-2 en el tumor primario. El paciente había sido tratado previamente con adriamicina + citoxeno, aunque en el momento de la extracción de sangre no se sometía a ninguna terapia para el cáncer. La muestra contenía 3 CTC, la totalidad de las cuales mostraba tinción positiva para la expresión de RFCE. Se detectó una activación significativa tanto de RFCE como de HER-2 en los ensayos de proximidad. Aunque el tumor primario de esta paciente era negativo para la sobreexpresión de HER-2, las rutas de RFCE/HER-2 se encontraban activas. El tratamiento con Herceptin®, sola o en combinación con quimioterapéuticos, o quimioterapéuticos solos, no resultaría una terapia adecuada para este paciente. Estos datos informan al médico de que estaría indicada una terapia que incluyese agentes con diana tanto en RFCE como en HER-2, tales como lapatinib, Herceptin® + ZACTIMA™, Herceptin® + Erbitux®, Herceptin® + Iressa®, o Herceptin® + Tarceva®.

Se informó de los tumores primarios de los pacientes 01-003 y 01-014 en las historias de los pacientes como positivos para sobreexpresión de HER-2. Ambos pacientes eran negativos tanto para el RE como para el RP. El paciente 01-003 se estaba tratando con Herceptin® y Taxotere®, mientras que el paciente 01-014 se estaba tratando con Herceptin®, carboplatino y Taxotere®. El paciente 01-003 presentaba 1 CTC que era negativo para la expresión de RFCE según tinción. No se detectó una activación significativa de RFCE ni de HER-2. Estos datos informan al médico de que la ruta controlada por HER-2 detectada originalmente en el tumor primario ya no se encuentra activa. Dado que el porcentaje de tumor primario que se tiñe de hecho con anticuerpo de HER-2 en un tumor primario con

puntuación positiva frecuentemente es de ~10%, no resulta inesperado que las CTC asociadas a recurrencia no estén sobreexpresando HER-2. La ruta de RFCE no se encuentra activa. No existe ningún motivo para tratar este paciente con terapias dirigidas contra RFCE o HER-2. El paciente 01-014 presentaba 3 CTC, la totalidad de las cuales mostró tinción positiva para la expresión de RFCE. No se detectó para este paciente fosforilación de RFCE ni de HER-2. A pesar del hecho de que las CTC mostraban expresión de RFCE, las rutas de RFCE no se encontraban activas. Unos niveles menores de RFCE en ausencia de HER-2 podrían no ser suficientemente elevados para activar las células cancerosas. Nuevamente no hay motivo para tratar este paciente con terapias dirigidas contra RFCE o HER-2.

- 10 La Tabla 42 muestra un resumen de la información diagnóstica para cada paciente y las recomendaciones de terapia.

Tabla 42

Resumen de información diagnóstica de los 5 pacientes con cáncer de mama en el estudio con las indicaciones de terapia resultantes.								
Nº de paciente	Estatus de RE	Estatus de RP	Estatus de HER-2	Nº de CTC	CTC RFCE	RFCEp	pHER-2	Terapia indicada (puede añadirse quimioterapia en combinación)
01-019	Positivo	Negativo	Negativo	4	Negativo	Negativo	Negativo	terapia hormonal
01-006	Negativo	Negativo	Desconocido	1	Positivo	Positivo	Positivo	lapatinib, Herceptin® + ZACTIMA™, Herceptin® + Erbitux®, Herceptin® + Iressa®, Herceptin® + Tarceva®
02-017	Negativo	Negativo	Negativo	3	Positivo	Positivo	Positivo	lapatinib, Herceptin® + ZACTIMA™, Herceptin® + Erbitux®, Herceptin® + Iressa®, Herceptin® + Tarceva®
01-003	Negativo	Negativo	Positivo	1	Negativo	Negativo	Negativo	(sin RFCE +/o inhibidores de HER-2)
01-014	Negativo	Negativo	Positivo	3	Positivo	Negativo	Negativo	(sin RFCE +/o inhibidores de HER-2)

- 15 Ejemplo 12. Un nuevo ensayo para cuantificar p95 ErbB2 y otros receptores tirosina quinasa truncados o proteínas de muestras clínicas.

HER-2, también conocido como ErbB2, es uno de cuatro miembros (HER-1, HER-2, HER-3 y HER-4) de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico o HER. Todos los receptores de HER comparten una estructura similar: un dominio de unión a ligando extracelular; una región transmembranal hidrofóbica corta, y un dominio de tirosina quinasa citoplasmático. La hetero- u homo-dimerización de receptores de HER, inducida por la unión de ligando o la sobreexpresión de receptores, conduce a la activación del receptor quinasa y a la posterior fosforilación de varios residuos de tirosina. A su vez, dichos residuos de tirosina fosforilados, situados dentro del extremo carboxilo-terminal de los receptores, reclutan moléculas de mediadores y activan las rutas de señalización que conducen a la modificación del crecimiento, diferenciación y supervivencia celulares. ErbB2 se

sobreexpresa/amplifica en aproximadamente 15% a 25% de los cánceres de mama humanos y su sobreexpresión/amplificación se asocia a un fenotipo agresivo.

El trastuzumab (Herceptin®), un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que se une con afinidad elevada al dominio extracelular de ErbB2, proporciona beneficios clínicos sustanciales en los pacientes con cáncer de mama avanzado con sobreexpresión de ErbB2 o con amplificación del gen *ErbB2* y mejora la supervivencia en combinación con quimioterapia. Además, recientemente se ha demostrado que Herceptin® mejora la supervivencia sin recaídas y la supervivencia global en pacientes con cáncer de mama temprano sobreexpresante de ErbB2.

Sin embargo, 70% a 80% de los pacientes con cáncer de mama sobreexpresante de ErbB2 no responden a Herceptin® al recibirlo como único agente terapéutico debido a resistencia primaria o adquirida. Existen varios mecanismos potenciales para la resistencia a Herceptin®, incluyendo: la inactivación o la pérdida de fosfatasa y delección de homólogo de la tensina en el cromosoma 10 (PTEN); la activación de otros receptores de tirosina quinasa, incluyendo el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1R) y la acumulación de formas truncadas del receptor de ErbB2 que no presentan el dominio aminoterminal extracelular de unión a Herceptin®.

Los polipéptidos ErbB2 truncados que contienen únicamente fragmentos carboxilo-terminales citosólicos, colectivamente conocidos como p95ErbB2 o fragmentos C-terminales, se encuentran frecuentemente en líneas celulares y tumores de cáncer de mama expresantes de ErbB2. De hecho, estos fragmentos son las formas de ErbB2 predominantes en algunos tumores. Estos fragmentos aparecen por el procesamiento proteolítico del dominio extracelular de ErbB2 de longitud completa o mediante el inicio alternativo de la traducción a partir de dos residuos de metionina (aminoácido 611 o 687) que se encuentran situados antes y después del dominio transmembranal, respectivamente.

La función biológica de p95ErbB2 no ha sido caracterizada por completo, aunque la sobreexpresión de p95ErbB2 se ha demostrado que conduce al crecimiento de xenoinjertos tumorales en ratones desnudos. La proteína p95ErbB2 presenta actividad de quinasa y esta actividad resulta necesaria para el crecimiento tumoral. El hecho de que el receptor p95ErbB2 truncado presenta actividad de quinasa en ausencia del dominio extracelular de unión a Herceptin® sugiere que los tumores expresantes de p95ErbB2 podrían ser resistentes a Herceptin® aunque sensibles a los efectos de inhibición de los inhibidores pan-HER tales como, por ejemplo, lapatinib (un inhibidor de tirosina quinasa de bajo peso molecular de ErbB2 que presenta actividad en pacientes con tumores expresantes de ErbB2 resistentes a Herceptin®). Los datos clínicos tempranos indican que 8 de cada 9 pacientes que expresan p95ErbB2 son resistentes a Herceptin®. También se ha demostrado recientemente que la resistencia adquirida a los inhibidores de tirosina quinasa pan-HER y Herceptin® se produce mediante un mecanismo de retroalimentación que conduce a la sobreexpresión de ErbB2 o al posible truncado de ErbB2, conduciendo a la formación de p95ErbB2.

Debido a que Herceptin® inhibe el truncado de ErbB2, una combinación de Herceptin® con inhibidores de tirosina quinasa pan-HER podría resultar ideal para tratar pacientes con resistencia adquirida a Herceptin® y/o inhibidores de tirosina quinasa pan-HER.

Con respecto a los métodos actuales para la detección de p95ErbB2, la presencia de p95ErbB2 en tumores mamarios humanos puede detectarse mediante análisis de transferencia western. Sin embargo, esta técnica requiere una gran cantidad de tejido tumoral recién congelado, una grave limitación porque este tejido se encuentra raramente disponibles en muestras clínicas. Los ensayos de detección de p95ErbB2 basados en inmunofluorescencia pueden llevarse a cabo en secciones de tejido rutinarias fijadas en formalina e incluidas en parafina de muestras clínicas. Esta técnica se basa en la observación de que p95ErbB2, pero no ErbB2 de longitud completa, se localiza tanto en el citoplasma como en la membrana celular. El método utiliza un anticuerpo anti-ErbB2 con diana en el dominio intracelular y se basa en la tinción citoplasmática diferencial. Sin embargo, los métodos basados en la inmunofluorescencia presentan una sensibilidad limitada (~10.000 receptores en cada célula) y no pueden detectar niveles bajos de p95ErbB2 que controlan la proliferación tumoral. Además, el polipéptido p95ErbB2 funcional se encuentra localizado sobre la membrana celular y no en el citoplasma. Además, resulta difícil diferenciar entre ErbB2 internalizado en el citoplasma y p95ErbB2 en el citoplasma.

El nuevo método de ensayo ultrasensible y altamente específico que se describe en la presente memoria supera las limitaciones de los métodos actuales de detección de p95ErbB2 y puede utilizarse en una amplia diversidad de muestras clínicas, tales como aspirados con aguja fina, biopsias cilindro y células tumorales circulantes (CTC) obtenidas a partir de sangre. Además de medir p95ErbB2, el método de la invención es capaz de detectar la activación de los cuatro miembros de la familia de ErbB conjuntamente con PTEN e IGF-1R a partir de cantidades minúsculas de material biológico.

Métodos ejemplares

La figura 13 muestra que ErbB2 de longitud completa puede extraerse de muestras clínicas utilizando anticuerpos que se unen al dominio extracelular de Erb2 unido a una perla de poliestireno o a un dextrano polimérico. El ensayo aprovecha la rápida cinética de la unión en fase solución, la extracción selectiva de proteína de longitud completa por anticuerpos receptores unidos a las perlas y la incapacidad de las proteínas unidas a perla de unirse a una matriz plana. Alternativamente, pueden utilizarse perlas cargadas magnéticamente para retener ErbB2 de longitud completa y sólo se aplicaría p95ErbB2 truncado a la micromatriz.

El método de ensayo "A", posteriormente, ilustra la detección de p95ErbB2 utilizando un ensayo de proximidad de elevadas sensibilidad y especificidad. El método de ensayo "B", posteriormente, ilustra la detección de p95ErbB2 utilizando un único anticuerpo. Estos métodos para detectar proteínas truncadas pueden aplicarse a varias proteínas diferentes, entre ellas, aunque sin limitación, p95ErbB2, el mutante V111 de RFCE (que participa en el glioblastoma, el cáncer colorrectal, etc.), otros receptores tirosina quinasa truncados, caspasas y similares.

A. Detección dual de proximidad de receptores truncados utilizando ELISA de micromatrices con amplificación de señales de tiramida.

El presente ejemplo ilustra un ELISA multiplex de alto rendimiento en micromatriz de proximidad de detección dual que presenta un rango dinámico superior, que resulta adecuado para analizar detectar receptores truncados tales como p95ErbB2 en células circulantes raras:

1) se imprimieron anticuerpos 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 tampón de bloqueo de Whatman.

3) Se añadieron 80 µl de lisado celular BT474 a cada portaobjetos con o sin perlas recubiertas con anticuerpo (extracelular) anti-ErbB2 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 anti-ErbB2 específico para el dominio intracelular de ErbB2 que se conjuga directamente a glucosa oxidasa (GO), y (2) un anticuerpo monoclonal que reconoce ErbB2 fosforilado que se conjuga directamente con peroxidasa de rábano picante (PRP). La incubación fue de 2 horas a temperatura ambiente.

5) Para la amplificación de señales, se añadieron 80 µl de biotina-tiramida a una concentración de 5 mg/ml y se hicieron reaccionar durante 15 minutos conjuntamente con glucosa 50 mM. El portaobjetos se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS. 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.).

6) A título de ejemplo no limitativo, el portaobjetos 1 puede informar sobre la activación total de ErbB2, mientras que el portaobjetos 2 puede informar sobre la activación de ErbB2 truncada. Basándose en la cantidad de ErbB2 activado o truncado total en la muestra, puede seleccionarse una terapia apropiada.

B. Detección de receptores truncados utilizando ELISA de micromatrices con amplificación de señales de tiramida.

El presente ejemplo ilustra un ELISA multiplex de alto rendimiento en micromatriz de proximidad de detección única que presenta un rango dinámico superior, que resulta adecuado para analizar detectar receptores truncados tales como p95ErbB2 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 tampón de bloqueo de Whatman.

3) Se añadieron 80 µl de lisado celular BT474 a cada portaobjetos con o sin perlas recubiertas con anticuerpo (extracelular) anti-ErbB2 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. El anticuerpo de detección utilizado era un anticuerpo anti-ErbB2 específico para el dominio intracelular de ErbB2 directamente conjugado con PRP. La incubación fue de 2 horas a temperatura ambiente.

5) Para la amplificación de señales, se añadieron 80 µl de biotina-tiramida a una concentración de 5 mg/ml y se hicieron reaccionar durante 15 minutos conjuntamente con peróxido de hidrógeno 1 mM. El portaobjetos se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.

6) Se añadieron 80 ml 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.).

7) A título de ejemplo no limitativo, el portaobjetos 1 puede informar sobre la activación total de ErbB2, mientras que el portaobjetos 2 puede informar sobre la activación de ErbB2 truncada. Basándose en la cantidad de ErbB2 activado o truncado total en la muestra, puede seleccionarse una terapia apropiada.

Una realización de la presente invención para detectar un receptor truncado tal como p95ErbB2 se muestra en la figura 14. La figura 14A muestra que las perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular (DEC) de un receptor de interés se une al receptor de longitud completa pero no al receptor truncado para eliminar cualquier receptor de longitud completa del ensayo. La figura 14B muestra que el receptor truncado, una vez unido a un anticuerpo de captura, seguidamente puede detectarse con un anticuerpo de detección que es específico para el dominio intracelular (DIC) del receptor de longitud completa. El anticuerpo de detección puede conjugarse directamente con peroxidasa de rábano picante (PRP). A continuación puede llevarse a cabo la amplificación de señales de tiramida (AST) para generar una señal que debe detectarse.

Con respecto a p95ErbB2, la figura 15 muestra que el pretratamiento con perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular (DEC) de ErbB2 (HER-2) eliminó prácticamente por completo la señal de ErbB2 de longitud completa sin afectar a la señal de dominio intracelular (DIC) de ErbB2. La reducción de la señal de ErbB2 de longitud completa era dependiente de la concentración de las perlas con acoplamiento de anticuerpo de DEC de HER-2 que se utilizaron en el ensayo, ya que el incremento de la cantidad de perlas con anticuerpo acoplado de 4 µg/l a 12 µg/ml redujo la señal de ErbB2 de longitud completa de 9,59% a 2,84%.

Las figuras 16 y 17 confirman que p95ErbB2 era detectado específicamente utilizando los métodos de ensayo descritos anteriormente. Tal como se muestra en la figura 16, el tratamiento de APMA (acetato (4-aminofenil)mercúrico) incrementó la fosforilación de p95ErbB2 en células BT474. La figura 17 muestra que la heregulina incrementa la fosforilación de p95ErbB2 en células T47D.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los métodos descritos anteriormente para la detección de proteínas truncadas tales como p95ErbB2 en una muestra de paciente proporcionan por lo menos las ventajas siguientes respecto a métodos disponibles actualmente:

- 1) Mayor sensibilidad, proporcionando la capacidad de detectar receptores truncados a partir de células individuales.
- 2) Mayor especificidad.
- 3) La capacidad de informar de una ruta entera utilizando micromatrices multiplexadas en lugar de una única proteína.
- 4) Escalabilidad.

Ejemplo 13. Selección de pacientes para el tratamiento con cáncer de mama invasivo sin afectación ganglionar de estadio I ó II, tras la identificación del riesgo de recurrencia con un panel de expresión génica.

Se han desarrollado paneles de marcadores de expresión génica que predicen la probabilidad de pronóstico y/o recurrencia de cáncer de mama en diversas poblaciones de mujeres con, por ejemplo, enfermedad sin afectación ganglionar. Estos paneles génicos pueden resultar útiles para identificar mujeres que es improbable que experimenten recurrencia y, de esta manera, que es improbable que se beneficien de la quimioterapia adyuvante. Los paneles de expresión pueden utilizarse para identificar mujeres que pueden evitar con seguridad la quimioterapia adyuvante, sin afectar negativamente los resultados de periodo sin enfermedad y de supervivencia global. Entre los sistemas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, Oncotype DX™, que es un panel de 21 genes de Genomic Health, Inc. (Redwood City, CA); MammaPrint®, que es un panel de 70 genes de Agendia (Amsterdam, Países Bajos), y un panel de 76 genes de Veridex (Warren, NJ). Estos paneles pueden utilizarse conjuntamente con el análisis de la activación de rutas para determinar la necesidad de incluir quimioterapia con las terapias dirigidas apropiadas seleccionadas utilizando los métodos descritos en los Ejemplos anteriores.

El protocolo siguiente proporciona una realización ejemplar de la presente invención en la que se utiliza el perfilado de expresión génica conjuntamente con el perfilado del estado de activación para seleccionar la terapia dirigida apropiada o la combinación de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer de mama:

1) se recoge una muestra tumoral con un grosor mínimo de 3 mm y un grosor máximo de 5 mm utilizando un punzón para biopsias. La biopsia se introduce directamente en el tubo para muestras que contiene conservante RNARetain™. El tubo se envía inmediatamente a Agendia para su análisis con el ensayo MammaPrint®.

2) El informe de ensayo de Agendia asigna al paciente al grupo de "buena" firma/riesgo bajo o a un grupo de "mala" firma/riesgo alto. En el caso de que el paciente se encuentre en el grupo de riesgo bajo, puede evitar con seguridad la quimioterapia adyuvante sin afectar su nivel de supervivencia sin enfermedad y global.

3) El ensayo MammaPrint® resulta aplicable a pacientes tanto positivos para RE como negativos para RE. Tras determinar el estatus de RE y de ErbB2, el paciente es asignado a una de las subclases de cáncer de mama indicadas en el Ejemplo 8. Las cuatro subclases principales eran las siguientes:

1. RE+/RP+/ErbB2-
2. RE+/ErbB2+
3. RE-/ErbB2+
4. ER-/RP-/ErbB2

4) Se aíslan células tumorales (por ejemplo CTC) a partir de sangre y se preparan para el análisis tal como se describe en el Ejemplo 1. Alternativamente, puede utilizarse una biopsia con aguja fina para preparar un extracto de células tumorales tal como se describe en el Ejemplo 2. Las preparaciones celulares se someten a ensayo tal como se describe en el Ejemplo 3 ó 4. El perfil de activación se evaluó de manera similar tal como se describe en el Ejemplo 8 (Tablas 4 a 22), Ejemplo 9 (Tablas 23 a 31) y Ejemplo 10 (Tablas 32 a 35). Se selecciona la terapia dirigida o combinación de terapias dirigidas apropiada. En el caso de que el paciente se encuentre en el grupo de riesgo bajo, no se añade ninguna quimioterapia. En el caso de que el paciente se encuentre en el grupo de riesgo elevado, la quimioterapia seleccionada por el médico basándose en la información clínica se añade a las terapias dirigidas.

Ejemplo 14. Selección de pacientes para el tratamiento tras la determinación del tejido primario de origen mediante un panel de expresión génica.

Aproximadamente 3% a 5% de todos los tumores metastásicos se clasifican en la categoría de cáncer de tumor primario desconocido (TPD). El diagnóstico correcto del tejido de origen resulta importante en las decisiones de tratamiento debido a que las terapias actuales se basan en gran parte en el sitio anatómico. Los paneles de expresión génica pueden resultar útiles para identificar mujeres con cáncer metastásico que se beneficiarían de una terapia consistente con la administrada en mujeres diagnosticadas inicialmente con cáncer de mama. Entre los sistemas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el ensayo de TPD de Rosetta Genomics, que clasifica los cánceres y tejidos de origen mediante el ensayo de los patrones de expresión de los microARN (ver, por ejemplo, la solicitud publicada de patente PCT n° WO 08/117278); el ensayo CancerTYPE ID™ de Aviara DX (Carlsbad, CA), un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el sitio primario de origen de 39 tipos tumorales, y el ensayo Pathwork® Tissue of Origin Test (Sunnyvale, CA), que mide la expresión de más de 1.600 genes en una micromatriz y compara la "firma" de expresión génica de un tumor con la de 15 tipos de tejido conocidos. Tras identificar que en el paciente la mama es el tejido de cáncer primario, pueden utilizarse perfiles de activación de rutas para seleccionar las terapias dirigidas apropiadas que deben incluirse en el programa de tratamiento.

El protocolo siguiente proporciona una realización ejemplar de la presente invención en la que se utiliza el perfilado de expresión génica conjuntamente con el perfilado del estado de activación para seleccionar la terapia dirigida apropiada o la combinación de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer de mama:

1) Se obtienen del paciente dos o más portaobjetos con secciones de 7 mm de grosor de un tejido extirpado quirúrgicamente o mediante biopsia con aguja fina, de un tumor metastásico. Estas células se fijan en formalina y se incluyen en parafina (FFPE). Un portaobjetos adicional teñido con H&E del mismo tumor se tiñe con H&E.

2) Un patólogo revisa el portaobjetos teñido con H&E e indica el área que debe recolectarse para el ensayo CancerTYPE ID™. Los portaobjetos se envía a Aviara DX para el análisis.

3) El informe de ensayo de Aviara DX indica los 5 sitios de origen más probables según un análisis del vecino k más próximo y se deriva una predicción. En el caso de que la predicción para el paciente sea que el tumor de origen desconocido es de mama, pueden evaluarse las células tumorales del paciente para la activación de rutas.

4) Se aíslan células tumorales (por ejemplo CTC) a partir de sangre y se preparan para el análisis tal como se describe en el Ejemplo 1. Alternativamente, puede utilizarse una biopsia con aguja fina para preparar un extracto de células tumorales tal como se describe en el Ejemplo 2. Las preparaciones celulares se someten a ensayo tal como se describe en el Ejemplo 3 ó 4. El perfil de activación se evaluó de manera similar tal como se describe en el Ejemplo 8 (Tablas 4 a 22), Ejemplo 9 (Tablas 23 a 31) y Ejemplo 10 (Tablas 32 a 35). Se selecciona la terapia dirigida o combinación de terapias dirigidas apropiada.

Ejemplo 15. Conjunto nuevo de ensayos de cáncer de mama utilizando ensayos de proximidad.

Antecedentes:

En 2008, se identificó un total estimado de 182.460 nuevos casos de cáncer de mama invasivo en mujeres de los E.E.U.U. Aproximadamente 20% de mujeres con cáncer de mama presentaba una sobreexpresión de HER-2 en el momento del diagnóstico. Los cánceres de mama con sobreexpresión de HER-2 (positivos para HER-2) se asocian a formas más agresivas de cáncer y por lo tanto resultan en tasas de supervivencia más bajas y tasas de recurrencia más altas. Los pacientes positivos para HER-2 con frecuencia se tratan con el fármaco de anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin®). Sin embargo, la Herceptin® es un tratamiento caro y potencialmente cardiotoxico; por lo

tanto, es imperativa una identificación exacta de los candidatos para optimizar los resultados clínicos. La Herceptin® actúa bloqueando HER-2 y por lo tanto reduce el crecimiento de las células tumorales. El lapatinib (Tykerb®) es un inhibidor de quinasa de molécula pequeña utilizado frecuentemente para pacientes en los que ha fracasado la terapia con Herceptin®.

Opciones de ensayo de HER-2 actuales:

El estatus de HER-2 típicamente se evalúa mediante: (1) ensayo de proteína receptora utilizando un ensayo inmunohistoquímico (IHC), o (2) la amplificación génica utilizando una técnica de ensayo de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Sin embargo, se acepta de manera general que los métodos de ensayo actuales no son exactos y pueden ser muy variables entre laboratorios y que pueden variar según diferencias en la manipulación de los especímenes antes de su recepción en el laboratorio. De hecho, la evidencia disponible sugiere que aproximadamente 20% de los ensayos de HER-2 actuales podrían ser inexactos (ASCO/CAP Guidelines for HER-2 Testing in Breast Cancer, J. Clin. Oncology, 2007).

Ensayos de cáncer de mama basados en un ensayo de proximidad:

El nuevo conjunto de ensayos de cáncer de mama descrito en el presente ejemplo aprovecha los ensayos multiplex de proximidad (es decir, de tres anticuerpos) de alto rendimiento descritos en la presente memoria. Estos ensayos diagnósticos resultan particularmente útiles para determinar la expresión y la activación de HER-2 en las células tumorales circulantes (CTC) o en el líquido aspirado con aguja fija (AGF) de pacientes con cáncer de mama, y ayudará en la selección de la terapia para los pacientes con cáncer de mama.

El protocolo siguiente describe el formato estándar utilizado para todos los ensayos indicados en el presente ejemplo:

1. Recogida de la muestra de sangre:
 - a. Recoger dos tubos de 7,5 ml con sangre.
 - b. Utilizar las perlas magnéticas con molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM) de Veridex, con proteínas de unión específicas para las células epiteliales para separar las células tumorales circulantes (CTC) de otros componentes de la sangre.
 - c. Lavar la muestra.
2. Activar una muestra (se activarán únicamente las células vivas) y lisar las células en la misma.
3. Lisar las células de la otra muestra.
4. (Ésta es la etapa que es variable según el ensayo) Utilizar ensayos de proximidad en micromatriz para detectar dos proteínas (por ejemplo proteínas de transducción de señales) y citoqueratina en la muestra activada para cuantificar las proteínas activadas totales y la citoqueratina:
 - a. Se fijan a la micromatriz tres anticuerpos monoclonales, específicos de las dos proteínas y citoqueratina (CK).
 - b. La muestra se vierte sobre el chip micromatriz, permitiendo que los analitos se unan a los anticuerpos monoclonales específicos de los mismos.
 - c. Se vierte sobre el chip micromatriz (dos anticuerpos monoclonales por cada analito) una mezcla de seis anticuerpos monoclonales adicionales. Con el fin de que se produzca fluorescencia en el sitio de un analito, deben unirse a ese analito los tres anticuerpos monoclonales específicos (el anticuerpo que se encuentra fijo y los dos anticuerpos que se han vertido).
5. Análisis en micromatriz de las dos proteínas en la muestra inactivada para cuantificar las proteínas totales.
6. Cada resultado de proteína activada se calibra con la muestra inactivada. Esto rinde los resultados de proteína cuantitativos con un resultado "+" o "-" para cada uno de los tres analitos.

Producto A [Herceptin®]: el presente ensayo es un ensayo de activación de ErbB de línea base para detectar la activación/fosforilación de HER-2. El presente ensayo también es un ensayo de activación de ErbB mejorado para la utilización con pacientes de estadio III y IV para determinar las discrepancias de HER-2. Se llevaron a cabo ensayos de proximidad en micromatriz para detectar ErbB1/HER-1, ErbB2/HER-2 y citoqueratina en la muestra activada con el fin de cuantificar las proteínas activadas totales y la citoqueratina. Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra ErbB1/HER-1 y ErbB2/HER-2, mientras que se utilizó un anticuerpo de la pancitoqueratina para las células epiteliales. La señal cuantitativa describe los niveles de activación y expresión de las proteínas HER-2 y HER-1. La puntuación de activación relativa se deriva a partir de una proporción entre fosforilación y expresión. El ensayo cuantifica: la activación de HER-2 (fosforilación), la expresión de HER-2, la activación de HER-1 (fosforilación), la expresión de HER-1 y la pancitoqueratina (para la normalización del número de células). El ensayo presenta una sensibilidad elevada ya que la activación de HER-2 se detecta en células tumorales circulantes individuales. El ensayo también presenta una especificidad $\geq 99\%$ medida por una reactividad cruzada inferior a 1% con otros marcadores. Reproducibilidad (intraensayo): CV = 5-15%. Reproducibilidad (entre ensayos): CV = 10-20%. El informe de ensayo proporciona lo siguiente: (1) la fosforilación de HER-2 y HER-1, informada como una cantidad cuantitativa y como positiva o negativa; (2) la expresión de HER-2 y HER-1, informada como una cantidad

cuantitativa y como positiva o negativa, y (3) la cuantificación de la citoqueratina. En el caso de que los niveles de HER-1 y HER-2 sean normales pero los niveles de citoqueratina sean elevados, esto sería diagnóstico del cáncer de mama pero no indicaría la utilización de terapias dirigidas a HER-1 ó HER-2.

5 Producto B [Ensayo de inclusión de Tykerb[®]]: el presente ensayo es un ensayo de activación de ErbB mejorado que incluye la detección de HER-2 p95 y RFCE. En particular, es un ensayo de inclusión de terapia con lapatinib (Tykerb[®]) para pacientes positivos para HER-2 en los que ha fracasado el tratamiento con Herceptin[®]. El presente ensayo ayuda en la selección y seguimiento de los pacientes de Herceptin[®] y en el cambio de los pacientes bajo
10 terapia con Herceptin[®] a terapia con Tykerb[®]. Se llevaron a cabo ensayos de proximidad en micromatriz para detectar ErbB1/HER-1, p95HER-2 y citoqueratina en la muestra activada con el fin de cuantificar las proteínas activadas totales y la citoqueratina. Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra ErbB1/HER-1 y p95HER-2, mientras que se utilizó un anticuerpo de la pancitoqueratina para las células epiteliales. El ensayo cuantifica: la activación de HER-2 p95 (fosforilación), la expresión de HER-2 p95, la activación de HER-1 (fosforilación), la expresión de HER-1 y la pancitoqueratina (para la normalización del número de células). El presente ensayo puede
15 validarse en un ensayo clínico de pacientes metastásicos con enfermedad HER-2 p95 que habían sido clasificados previamente como positivos para HER-2 basándose en IHC o FISH y en los que había fracasado la Herceptin[®]. Los pacientes que demuestran activación de HER-2 p95 y HER-1 basándose en el ensayo de proximidad pueden tratarse con Tykerb[®]. El ensayo mostrará un beneficio en supervivencia global en pacientes positivos para HER-2 p95 tratados con Tykerb[®]. Debido a que HER-2 p95 no presenta el dominio extracelular de unión a Herceptin[®] de HER-2, los niveles elevados de HER-2 p95 descartarían la Herceptin[®] y por el contrario indicarían la utilización de Tykerb[®]. Sin embargo, en el caso de que los niveles de HER-1 y HER-2 sean normales pero los niveles de citoqueratina sean elevados, esto sería diagnóstico de cáncer de mama pero no indicaría la utilización de terapias dirigidas a HER-1 ó HER-2.

25 La figura 18 muestra múltiples puntos en los que pueden utilizarse los métodos de la presente invención para influir sobre la práctica clínica con respecto a la selección de la terapia para el cáncer de mama apropiada para un paciente particular.

Ejemplo 16. Preparación de dextrano activado por sulfhidrilo.

30 El presente ejemplo describe un protocolo para incorporar grupos sulfhidrilo libres en una molécula de dextrano. Tal como se ilustra en el Ejemplo 17, las moléculas de dextrano modificadas por sulfhidrilo pueden utilizarse para preparar conjugados con un anticuerpo y glucosa oxidasa (GO) para la utilización en los ensayos de detección individual y de proximidad descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, una molécula de dextrano de
35 500 kDa activada con sulfhidrilo puede conjugarse con un anticuerpo y GO de manera que la proporción de anticuerpo:GO:dextrano sea de 2:12:1. La conjugación de una molécula de dextrano de 500 kDa activada con sulfhidrilo con el anticuerpo y GO incrementa ventajosamente la sensibilidad del ensayo en aproximadamente 10 veces. En otras realizaciones, puede conjugarse con un anticuerpo y peróxidasa de rábano picante (HRP) una molécula de dextrano de 70 kDa activada por sulfhidrilo.

Definiciones y acrónimos:

1. Dextrano = un polímero de glucosa
2. Ácido clorhídrico = HCl
3. Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida = EDC
4. Solución salina tamponada con fosfato = PBS
5. Hidróxido sódico = NaOH
6. Ácido 2-morfolinoetanosulfónico = MES
7. Ácido etilendiaminetetraacético = EDTA

Instrumentos y equipos:

1. Baño de agua (Fisher, Isotemp 210)
2. Lector de placas de ELISA (Molecular Devices, SpectraMAX1900)
3. Lavador de placas de ELISA (Nunc, Nunc-Immuno Wash 8)
4. Mezclador vortex (Fisher, Vortex Mixer)
5. Liofilizador (Virtis, Freezemobile 12)
6. Centrifuga (Beckman, GS-6R)
7. Agitador magnético (Coming, PC-410D)
8. Equipo para generar agua NANOpura (Barnstead, NANOpure Diamond)
9. Casete de diálisis (Pierce, 66380)

Reactivos, compuestos químicos y proveedores:

1. Dextrano 500 kDa (Fisher BP1580-100)
2. Ácido bromoacético (Sigma, 259357)
3. Hidróxido sódico (Fisher, S318-500)
4. Isopropanol (Fisher, A451-4)
5. Ácido clorhídrico 12 N (Fisher, A144-500)
6. Cisteamina (Sigma, M9768)
7. Hidrocloruro de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (Pierce, 22980)
8. Solución salina tamponada con fosfato (Cellgro, 21-040-CV)
9. Solución de ácido etilendiaminatetraacético 0,5 M (GIBCO, 15575-038)
10. Ácido 2-morfolinoetanosulfónico (Fluka 69892)
11. Solución salina tamponada con fosfato 10X (Fisher, BP399-500)

Tampones y soluciones:

1. NaOH 2,9 M: disolver 5,8 g de hidróxido sódico en 50 ml de agua nanopura.
2. Solución de tampón MES 50 mM: disolver 5,33 g de ácido 2-morfolinoetanosulfónico en 500 ml de agua NANOPura y ajustar el pH a 4,5 utilizando HCl 12 N.
3. Tampón de diálisis: añadir 10 ml de solución de EDTA 0,5 M y 100 ml de PBS 10X a 890 ml de agua nanopura hasta alcanzar una concentración final de 5 mM de EDTA en PBS.

Procedimiento:

Incorporación de grupos carboxilo en dextrano:

1. A un gramo de dextrano 500 kDa (2 mmoles) disuelto en 8,5 ml de NaOH 2,9 M en una probeta de polipropileno de 50 ml con tapón enroscable se añadieron 850 mg de ácido bromoacético. Tras mezclar intensamente con vórtex, el tubo se incubó en un baño de agua a 50°C durante la noche.
2. Tras la incubación, se añadió isopropanol a la mezcla de reacción hasta una concentración final de 70% (v/v) para precipitar el dextrano carboxilado. Tras mezclar con un mezclador vórtex, la solución se centrifugó a 3.000 rpm en una centrífuga Beckman a temperatura ambiente durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
3. El precipitado se redisolvió en 10 ml de agua nanopura y se repitió dos a tres veces adicionales la precipitación con isopropanol hasta no obtener más precipitado con la adición de isopropanol. A continuación, la solución transparente de isopropanol al 70% se ajustó a pH 4 con HCl 12 N mezclando con vórtex para regenerar el precipitado y la mezcla se centrifugó nuevamente a 3.000 rpm en la centrífuga Beckman durante 15 minutos para precipitar el dextrano carboxilado y se descartó el sobrenadante.
4. Para eliminar el ácido bromoacético residual, el precipitado se redisolvió en 10 ml de agua nanopura y se ajustó el pH de la solución a 4 con HCl. A continuación, se añadió isopropanol hasta el 70% en volumen para precipitar el dextrano carboxilado. Tras mezclar con un mezclador vórtex, la solución se centrifugó a 3.000 rpm en una centrífuga durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento de lavado se repitió un total de tres veces.
5. Tras el último lavado, el precipitado se disolvió nuevamente en 10 ml de agua nanopura y la solución se liofilizó a sequedad en el liofilizador para eliminar el HCl.
6. El dextrano carboxilado liofilizado se almacenó a -70°C.

Conversión de los grupos carboxilo en el dextrano carboxilado en grupos sulfhidrido:

1. Disolver 10 mg del dextrano carboxilado liofilizado en 0,5 ml de tampón MES 50 mM, pH 4,5 en un tubo de vidrio marrón de 2 ml.
2. A la solución de dextrano carboxilado se añaden 1,42 mg de EDC y la mezcla se agita a 40°C durante 30 minutos.
3. A continuación, se añaden diez miligramos de cisteamina a la mezcla y la solución resultante se agita durante una hora adicional a 4°C.
4. Tras agitar, la mezcla se transfiere a un casete de diálisis de 0,5 a 3,0 ml con un valor de corte de peso molecular de 10.000 y se dializa frente a 500 ml de PBS, pH 7,4, a 4°C durante la noche.
5. A continuación, el tampón de diálisis se cambia a EDTA 5 mM/PBS y se dializa durante dos horas adicionales. El procedimiento de diálisis se repite una vez adicional.
6. El número total de grupos sulfhidrido incorporados en cada molécula de dextrano de 500 kDa se determina mediante ensayo de Ellman.
7. Se preparan alícuotas de cincuenta microlitros de la solución de dextrano con incorporación de sulfhidrilos en tubos Eppendorf de 1 ml y se liofilizan las alícuotas. Las alícuotas liofilizadas se mantienen a -70°C durante el almacenamiento.

Ejemplo 17. Preparación de un conjugado de anticuerpo de HER2-glucosa oxidasa-dextrano.

El presente ejemplo describe un procedimiento para conjugar un anticuerpo de HER-2 dirigido a un dominio extracelular y glucosa oxidasa (GO) con una molécula de dextrano de 500 kDa activada por sulfhidrilo. El conjugado de anticuerpo de HER2-GO-dextrano puede utilizarse en los ensayos de detección individual y de proximidad descritos en la presente memoria.

Definiciones y acrónimos:

1. Succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexán-1-carboxil-(6-amidocaproato) = LC-SMCC
2. Dimetilsulfóxido = DMSO
3. Hidróxido sódico = NaOH
4. Ácido clorhídrico concentrado = HCl
5. Solución salina tamponada con fosfato = PBS
6. Ácido etilendiaminatetraacético = EDTA
7. Sal sódica de ácido 2-(etilmercuriomercurio)benzoico = Timerosal
8. HPLC = Cromatografía líquida de Alto Rendimiento

Instrumentos y equipos:

1. Sistema HPLC (Agilent Technologies; serie 1100)
2. Columna de cromatografía de exclusión por tamaño (Phenomenex, BioSep-SEC-S 3000)
3. Espectrofotómetro (Hitachi; U-200)
4. Centrífuga (Beckman, GS-6R)
5. Agitador magnético (Coming, PC-410D)
6. Lector de placas de ELISA (Molecular Devices, SpectraMAX190)
7. Mezclador vortex (Fisher Scientific, 02-215-365)
8. Columna de desalado (Pierce, 43230)
9. Aparato Centricon YM-10 (Millipore, 4205)
10. Pipeta de 1 µl (Rainin, L-1000)
11. Pipeta de 200 µl (Rainin, L-200)
12. Pipeta de 20 µl (Rainin, L-20)
13. Pipeta de 2 µl (Rainin, L-2)
14. Pipeta multicanal (Rainin, L8-200)

Reactivos, compuestos químicos y proveedores:

1. Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HER-2 humano a una concentración de 1 mg/ml en PBS (Lab Vision, MS-301-PABX)
2. Glucosa oxidasa dializada (Prometheus)
3. Dextrano activado por sulfhidrilo (Prometheus)
4. LC-SMCC = Succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexán-1-carboxil-(6-amidocaproato) (Fisher, 22362)
5. DMSO = Dimetilsulfóxido (Sigma, D2650)
6. Albúmina de suero bovino (Sigma, A3294)
7. Hidróxido sódico (Fisher, S318-500)
8. Ácido clorhídrico concentrado (Fisher, A144-500)
9. PBS = Solución salina tamponada con fosfato (Cellgro, 21-040-CV)
10. Solución de ácido etilendiaminatetraacético 0,5 M (Invitrogen, 1758)
11. Timerosal (Sigma, T8784)

Tampones y soluciones:

1. Tampón EDTA 5 mM/PBS desgasificado, pH 7,2: añadir 2 ml de solución de EDTA 0,5 M a 200 ml de PBS y después burbujear gas argón en la solución resultante durante 5 minutos para eliminar todos los demás gases en la solución.
2. Solución de BSA al 10%/PBS: Disolver 100 mg de BSA en 10 ml de PBS y filtrar la solución por un filtro de 0,2 µm. La solución se mantiene en un congelador a -20°C.
3. Solución de timerosal al 10%/PBS: Disolver 100 mg de timerosal en 10 ml de PBS y filtrar la solución por un filtro de 0,2 µm. La solución se mantiene en un congelador a -20°C.
4. TF 0,1 M (tampón fosfato), pH 6,8.

Procedimiento:

Preparación de la solución de CL-SMCC para el uso inmediato en la reacción de activación:

1. Sacar una botella de LC-SMCC del congelador a -20°C y dejar que se caliente hasta la temperatura ambiente.
2. Pesar entre 1 y 2 mg de LC-SMCC en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y añadir el volumen correcto de DMSO para preparar una solución de 4,5 mg/ml (LC-SMCC 10 mM). Almacenar el LC-SMCC restante nuevamente en el congelador.

Activación de LC-SMCC del anticuerpo de HER-2:

1. Añadir 2,3 ml de la solución de CL-SMCC 10 mM a 0,5 ml de la solución de anticuerpo de HER-2, que contiene 500 mg del anticuerpo y mezcla con vórtex inmediatamente para iniciar la reacción. Tras mezclar con vórtex, se mantiene la mezcla a temperatura ambiente para continuar la reacción durante 30 minutos.
2. Simultáneamente preequilibrar una columna de desalado mediante lavado de la misma con 50 ml de tampón de EDTA 5 mM/PBS desgasificado.
3. Tras completar la activación de la glucosa oxidasa con LC-SMCC, la mezcla de activación se carga en la columna de desalado y la columna se eluye con tampón de EDTA 5 mM/PBS desgasificado a temperatura ambiente. La solución eluida se recoge en fracciones de 0,5 ml y se realiza un seguimiento de la absorbancia de U.V. a 280 nm con un espectrofotómetro.
4. Las fracciones que contienen el anticuerpo activado según las absorbancias de U.V. se agrupan y se mantienen sobre hielo para la reacción siguiente.

Activación con LC-SMCC de glucosa oxidasa:

1. Ajustar el volumen de 0,16 ml de glucosa oxidasa dializada, que contiene 4 mg del enzima, a 0,5 ml con el tampón de EDTA 5 mM/PBS desgasificado.
2. Añadir 12,4 ml de la solución de LC-SMCC 10 mM a los 0,5 ml de solución de glucosa oxidasa y se mezcla con vórtex inmediatamente para iniciar la reacción. Tras mezclar con vórtex, se mantiene la mezcla a temperatura ambiente para continuar la reacción durante 30 minutos.
3. Simultáneamente preequilibrar una columna de desalado mediante lavado de la misma con 50 ml de tampón de EDTA 5 mM/PBS desgasificado.
4. Tras completar la activación de la glucosa oxidasa con LC-SMCC, la mezcla de activación se carga en la columna de desalado y la columna se eluye con tampón de EDTA 5 mM/PBS desgasificado a temperatura ambiente. La solución eluida se recoge en fracciones de 0,5 ml y se realiza un seguimiento de la absorbancia de U.V. a 280 nm con un espectrofotómetro.
5. Las fracciones que contienen la glucosa oxidasa activada según las absorbancias de U.V. se agrupan y se mantienen sobre hielo para la reacción siguiente.

Conjugación del anticuerpo de HER-2 activado y de la glucosa oxidasa activada con dextrano activado por sulfhidrilo:

1. A una alícuota de 1 mg liofilizada de dextrano activado por sulfhidrilo se añadieron 50 ml de agua nanopura para preparar una solución de 20 mg/ml de dextrano activado por sulfhidrilo.
2. A la solución de anticuerpo activado agrupada se añadió un volumen de solución combinada de glucosa oxidasa activada correspondiente a 3 mg de glucosa oxidasa, seguida de 34,3 µl de la solución de dextrano modificada por sulfhidrilos, proporcionando una proporción molar aproximada de anticuerpo:glucosa oxidasa:dextrano de 2:12:1. Tras mezclar con vórtex, la mezcla se mantuvo a 4°C durante la noche.
3. El exceso de grupos sulfhidrilo remanente en el dextrano modificado se bloqueó mediante la adición de 56,4 ml de solución 1 mg/ml de N-etilmaleimida en tampón de EDTA/PBS 0,5 mM desgasificado y se continuó con la reacción de bloqueo durante 3 horas a 4°C.

Purificación de un conjugado de anticuerpo de HER2-glucosa oxidasa-dextrano:

1. Tras la reacción de bloqueo, la solución de anticuerpo de HER-2-glucosa oxidasa-dextrano se concentró a ~300 ml en un aparato Centricon dotado de una membrana YM-10 de valor de corte de peso molecular 10.000.
2. La solución concentrada se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y el tubo se centrifugó a 16.000g durante 3 minutos para eliminar la pequeña cantidad de precipitado.
3. El sobrenadante se transfirió a un vial de muestras de HPLC y el volumen de la solución se ajustó a 320 ml con el tampón de EDTA/PBS 5 mM desgasificado para la purificación mediante HPLC.
4. Se inyectaron cien microlitros de la solución conjugada en una columna de exclusión por tamaño BioSep-SE-S 300 en un sistema de HPLC de Agilent y la proteína conjugada se separó mediante elución con PB 0,1 M, pH

6,8, a un caudal de 0,5 ml/min durante 40 minutos y se realizó un seguimiento de la solución eluida a partir de la absorbancia de UV a 280 nm.

5. El primer pico de absorción de UV de las fracciones de elución se agrupó y se reservó sobre hielo.

6. Los 200 ml restantes de la solución conjugada se purificaron también de manera similar y se agrupó la totalidad de los primeros picos de absorción de UV de las tres HPLC. La solución conjugada agrupada se ajustó a BSA al 0,1% con la solución de BSA al 10%/PBS y el timerosal al 0,02% con la solución de timerosal al 10%/PBS para el almacenamiento a largo plazo a -70°C.

7. La actividad enzimática de glucosa oxidasa presente en el conjugado de anticuerpo de HER-2-glucosa oxidasa-dextrano se determinó mediante un ensayo funcional de glucosa oxidasa.

8. La actividad de anticuerpo presente en el conjugado de anticuerpo de HER-2-glucosa oxidasa-dextrano se determinó mediante un ensayo de ELISA de competición.

Ejemplo 18. Nuevo ensayo multiplexado para detectar la activación de los receptores de tirosina quinasa de la familia de ErbB en una célula tumoral circulante.

Resumen:

El perfilado de expresión/activación de quinasas y de otras moléculas de rutas de transducción de señales en un muestreo en serie de tejidos tumorales proporciona información valiosa sobre los cambios producidos en las células tumorales como función del tiempo y las terapias. Este perfilado temporal de la progresión tumoral permite al médico realizar un seguimiento de las firmas de cáncer en rápido cambio en cada paciente. El presente ejemplo ilustra un nuevo y robusto ensayo para detectar el nivel de expresión y el grado de fosforilación de la familia de ErbB de receptores de tirosina quinasa (RTK) y demuestra las ventajas de utilizar dicho sistema diagnóstico de guía de la terapia con sensibilidad al nivel de células individuales. El ensayo se basa generalmente en muestras tales como aspirados con aguja fina (AGF) y sangre y consigue elevadas sensibilidad y especificidad para interrogar un número limitado de células cancerosas obtenidas de dichas muestras.

Introducción:

La aparición y progresión del cáncer puede estar asociadas a una expresión y activación anormalmente reguladas de los receptores y de otros componentes de la ruta de transducción de señales. La activación anormal de HER-1 y HER-2 se ha asociado a diversos tipos de progresión del cáncer. Los métodos de perfilado de los patrones de fosforilación de HER-1 y HER-2 podrían proporcionar información valiosa sobre la patogénesis global de la enfermedad y por lo tanto conducir a una mejor selección de la terapia, al identificar las moléculas relevantes que causan la enfermedad. El ensayo descrito en la presente memoria se basa en (1) una plataforma micromatriz múltiple de proteínas en combinación con (2) un procedimiento de amplificación de señales de triple canalización de anticuerpo-enzima. La plataforma micromatriz ofrece la ampliabilidad necesaria para adaptarse a múltiples marcadores, así como la escalabilidad requerida para su despliegue comercial. El nuevo diseño único del ensayo descrito en la presente memoria lo proporciona el enfoque de triple anticuerpo-enzima, que proporciona sensibilidad ultraelevada, conservando la especificidad. En realizaciones en las que se utiliza el ensayo para detectar y cuantificar aquellas dianas que se encuentran fosforiladas, y por lo tanto activadas, el ensayo puede llevarse a cabo de la manera siguiente:

1. La diana seleccionada es capturada por anticuerpos específicos de diana imprimidos en diluciones en serie sobre una superficie de micromatriz. La figura 19 ilustra una realización del ensayo de la presente invención, el cual se basa en la colocación de dos anticuerpos detectores adicionales unidos a enzimas para los sucesos de canalización posteriores para cada proteína diana unida.

2. En la realización mostrada en la figura 19, el complejo inmunológico formado por la unión inicial de la diana a anticuerpos de captura y la unión secundaria de los anticuerpos conjugados con glucosa oxidasa (GO) que reconocen un epítipo alternativo en las moléculas diana capturadas produce H_2O_2 en presencia de un sustrato de GO, tal como glucosa. GO es uno de los enzimas más rápidos que se conocen, con un número de renovación (TON) de $10^5/\text{min}$.

3. En la realización mostrada en la figura 19, la influencia local específica de diana de H_2O_2 seguidamente es utilizada por anticuerpos específicos de fosfopéptido conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, con un TON de $10^4/\text{min}$) para unirse al sitio fosforilado en las dianas capturas, amplificando de esta manera la señal específica de diana. La especificidad para la detección de las dianas fosforiladas se incrementa en gran medida a través del procedimiento colaborativo de inmunodetección y amplificación, dado el requisito de unión simultánea de tres tipos diferentes de anticuerpo.

La detección y cuantificación de tan sólo aproximadamente $2-3 \times 10^4$ sucesos de fosforilación se consigue rutinariamente mediante el ensayo descrito en la presente memoria, llevando su detección al nivel de células individuales. Esta configuración colaborativa de inmunoensayo puede aplicarse adicionalmente a la investigación de interacciones y estados de activación de proteínas.

Métodos:

Cultivo de tejidos: se obtuvieron de ATCC las líneas celulares SKBR3, MDA-MB-468, T47D y BT474. Las células se cultivaron en los medios de crecimiento siguientes en placas de cultivo de tejidos de 100 mm a 37°C en 5% de CO₂: medio SKBR3-5A de MacCoy con FBS al 10%; MDA-MB-468-DMEM, FBS al 10%; BT474-DMEM, FBS al 10%; T47D-RPMI 1640, FBS al 10%, 0,2 U/ml de insulina bovina. Las células se recolectaron a una confluencia de 70% a 80% con un procedimiento suave de desprendimiento (tratamiento con tripsina + posterior inactivación) y posteriormente se realizó un recuento y se lavaron con 1X PBS. Se llevó a cabo la estimulación celular con FCE 100 µM o heregulina P 20 µM o ambos en medio de crecimiento sin suero durante 5 minutos. A continuación, las células estimuladas se lavaron con 1X PBS y después se lisaron y se mantuvieron sobre hielo durante 30 minutos.

Impresión de portaobjetos: los anticuerpos de captura se diluyeron en 1x PBS con detergente. Se utilizó un impresor de micromatrices de contacto (Genetix) para la impresión sobre portaobjetos FAST de nitrocelulosa de 16 celdas (Whatman). El diámetro de punto era de aproximadamente 175 µm y los portaobjetos impresos se guardaron en una cámara desecada a 4°C.

Ensayo múltiple de proximidad: se incubaron los portaobjetos con tampón de bloqueo durante 1 hora y después se lavaron 3X con tampón TBST. A continuación, se añadieron los lisados celulares a cada celda para la incubación durante la noche a temperatura ambiente (RT). Tras completarse la unión primaria, los lisados se aspiraron y después se lavó cada celda varias veces con TBST. A continuación, se añadieron anticuerpos detectores secundarios (conjugados con GO o HRP) a cada celda durante 2 horas a RT. Los anticuerpos detectores secundarios no unidos se eliminaron mediante lavado con TBST y se añadió tampón de amplificación de señales que contenía glucosa y tiramida biotinilada a cada celda durante 15 minutos. Tras eliminar el exceso de tiramida biotinilada, se añadió estreptavidina conjugada con Alexa-647 para la detección de las señales.

Análisis de los datos: la cuantificación se llevó a cabo utilizando el software ScanArray Express de Perkin Elmer, y los datos obtenidos se corrigieron para intensidades de fondo locales y globales. Se utilizó un archivo GAL (GenePixArray) para proporcionar el nombre descriptivo e información de identificador y se incorporó en el archivo de resultados del análisis de imágenes. Las señales de los puntos por triplicado se promediaron y los datos se normalizaron para corregir la variabilidad entre celdas. Se utilizó un modelo de regresión no lineal para la cuantificación de la cantidad equivalente por celda para los valores correspondientes de unidades relativas de fluorescencia (URF). Los datos se ajustaron a una ecuación de Hill de cinco parámetros para generar las curvas de estándares. Se validó cada curva frente a controles conocidos. Se realizó una predicción de número conocido de células para la dilución, correspondiente a la curva con la pendiente más pronunciada en la intensidad de la muestra desconocida.

Transferencia western: tras obtener números aproximadamente iguales de lisados celulares para cada línea celular, se dividieron en alícuotas en viales de un solo uso. Se determinó la concentración de proteínas utilizando un ensayo de proteínas de ácido bicinchonínico (BCA). Se prepararon muestras con tampón para muestras que contenía β-mercaptoetanol, y tras someter a ebullición durante 5 minutos y enfriar hasta la RT, las muestras se cargaron en un gel de NuPage al 4-12% conjuntamente con una escalera de proteínas. Tras completar la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se lavó la membrana, se bloqueó con blotto al 5% y se incubó en primer lugar con anticuerpos primarios y después con secundarios, antes del procedimiento de detección con NBT/BCIP.

Resultados:

Sensibilidad: Se detectó la activación y expresión de HER-1 y HER-2 a un nivel de sensibilidad de una célula individual en múltiples líneas celulares (MDA-MB-468, A431, BT-474 y SKBr-3). Estas líneas celulares expresan aproximadamente 1x10⁶ RTK totales sobre la membrana celular de cada célula, aunque sólo llegan a fosforilarse subconjuntos de los RTK totales y esta fosforilación resulta necesaria para la activación de la ruta. Las células SKBR-3 presentan una activación espontánea de HER-2 debido a su amplificación y por lo tanto proporcionan una referencia de control positivo. Resulta necesario estimular las células MDA-MB-468 con FCE (TGF-α) para inducir la fosforilación de HER-1 y puede utilizarse su firma antes y después de la estimulación a modo de controles negativos y positivos. MDA-MB-468 presenta una activación de HER-1 marginal antes de la estimulación, mientras que ambas líneas celulares alcanzan un pico aproximadamente a 2-5% de sus RTK activadas (~0,5 a 1x10⁵ sucesos de fosforilación por célula). La figura 20 muestra que el formato de ensayo descrito en la presente memoria permite la detección de menos de 10⁵ sucesos de activación con sensibilidad de células individuales.

Tabla 43

	Nivel relativo de expresión de ErbB			Activación de RTK por cada célula (URF/célula)			
	ErbB1	ErbB2	ErbB3	FCE		HRG	
				pHER1	pHER2	pHER1	pHER2

MDA MB 468	10	--	2	4000	ND	4000	ND
BT 474	--	10	3	96	1200	ND	1200
T47D	--	2	4	60	80	ND	165
SKBR3	3	10	2	360	1334	105	353

Especificidad: la especificidad analítica del formato colaborativo de inmunoensayo descrito en la presente memoria fue de >99,99%, según el estudio comparativo realizado con múltiples líneas celulares con diversos niveles de RTK. Las líneas celulares utilizadas y su expresión de ErbB dominante y la activación de RTK tras la estimulación con FCE o HRG- β se muestran en la transferencia western en la figura 21. El perfil de activación de RTK para las células T47D, que expresan cierto nivel de ErbB2 y ErbB3 pero una cantidad extremadamente reducida de ErbB1, se muestra en la figura 22. El número de células requerido para detectar la EC20 (12.000 URF) de pHER-1 ó pHER-2 se utilizó para calcular la activación de RTK por cada célula (URF/célula), tal como se muestra en la Tabla 43. Al utilizar células MB468 que expresaban una cantidad extremadamente baja de HER-2, disponer de ~1.000 células por cada celda de reacción no resultaba suficiente para alcanzar la EC20, y este tipo de señal baja o no detectable en otras líneas celulares se indicó como "ND" en la Tabla 43. Las células MDA-MB-468 presentan un nivel de ~4.000 URF/célula de pHER-1 al estimularlas con FCE, pero no muestran un nivel detectable de pHER-2. Este formato colaborativo de inmunoensayo garantiza la ultraespecificidad, manteniendo simultáneamente su sensibilidad de ensayo subcelular- (10^4 a 10^5) molecular.

Conclusión:

El presente ejemplo ilustra un nuevo ensayo capaz de detectar específicamente el estado de fosforilación de los miembros de la familia ErbB de receptores con una sensibilidad que permite la utilización con células tumorales circulantes (CTC) raras. Mediante la identificación de la activación de HER1 y HER2 en las CTC, esta plataforma de ensayo puede proporcionar una guía, no sólo para la selección inicial de terapéuticos dirigidos, sino también para el seguimiento posterior de la progresión de la terapia. El perfilado de expresión/activación de quinasas y de otras moléculas de rutas de transducción de señales (mostrados en la figura 23) en un muestreo en serie de CTC proporciona información valiosa sobre los cambios producidos en las células tumorales como función del tiempo y de las terapias. Este enfoque diagnóstico de guía a la terapia puede introducirse en diversas etapas del control de la enfermedad, tal como se muestra en la figura 18. El perfilado temporal y espacial de progresión tumoral proporcionado por el formato de ensayo descrito en la presente memoria permite al médico clínico realizar un seguimiento de firmas de cáncer en rápido cambio en cada paciente. Debido a su sensibilidad y especificidad únicas, el formato de ensayo descrito en el presente ejemplo puede aplicarse a la detección de sucesos de fosforilación en miembros receptores de la familia de ErbB presentes en CTC raros. De esta manera, el presente método puede proporcionar una guía, no sólo para la selección inicial de terapéuticos dirigidos, sino también para el seguimiento posterior de progresión de la terapia.

En resumen, la plataforma de inmunoensayo colaborativa multiplex de proximidad descrita en la presente memoria proporciona información clínica valiosa de muestras limitadas con ultrasensibilidad y especificidad que ayuda al oncólogo en el mantenimiento o ajuste de las opciones de tratamiento de la enfermedad para cada paciente según un cambio del perfil "personal" del cáncer.

Ejemplo 19. Método para detectar la activación de los receptores de tirosina quinasa de la familia de ErbB.

La aplicación presenta tecnología capaz de detectar específicamente sucesos de fosforilación en la familia de ErbB de receptores de tirosina quinasa (RTK) con una sensibilidad al nivel de células individuales. En determinados aspectos, esta plataforma micromatriz multiplex de proteínas utiliza la formación de un inmunocomplejo único de "triple canalización de anticuerpo-enzima". En una realización, este complejo requiere la colocación de dos anticuerpos detectores conjugados con enzimas canalizadores correspondientes tras la unión de proteínas diana a los anticuerpos de captura. Los sucesos de canalización entre dos enzimas detectores en proximidad, glucosa oxidasa (GO, conjugada con anticuerpos anti-RTK) y peroxidasa de rábano picante (HRP, conjugada con sitios antifosforilados en los RTK) permite el perfilado de la RTK con una sensibilidad extrema. Este principio se aplicó a dos sistemas modelo de cáncer de mama con un número limitado de células diana: células de cáncer encontradas en una muestra de sangre completa de un paciente (células tumorales circulantes, CTC) y de líquido aspirado con agua fina (AGF).

En la presente memoria se informa de la detección con éxito de la activación (fosforilación) de HER1 y HER2 (pHER1 y pHER2) en un sistema modelo de CTC con un nivel de sensibilidad de una célula individual para las líneas celulares MDA-MB-468 y SKBr-3. La especificidad analítica del formato de "inmunoensayo de proximidad" fue de >99,99%, según estudios comparativos realizados con múltiples líneas celulares con diversos niveles de RTK. Además, en la presente memoria también se presentan modelos de xenoinjerto para diferentes tipos de cáncer de mama utilizando líneas celulares con grados variables de expresión de ErbB-RTK (MDA-MB-231, MDA-MB-468 y

MDA-MB-435) para demostrar su aplicación potencial con muestras de AGF. Aunque pudieron detectar niveles moderados de pHER2 y pHER1 en AGF de xenoinjerto de MD-MB-231 y se obtuvo un nivel de pHER1 significativo en AGF procedente de xenoinjertos de MDA-MB-468, no se detectó la activación de HER1 ó HER2 en AGF obtenido de xenoinjertos de MDA-MB-435. Estos resultados del sistema modelo de xenoinjerto-AGF concuerdan con el perfil de la línea celular reguladora, lo que demuestra que este método puede utilizarse para detectar la activación de los receptores de ErbB en cualquier tipo de muestra obtenida en procedimientos mínimamente invasivos (por ejemplo de CTC a AGF).

La capacidad del presente ensayo de realizar un seguimiento del estatus de activación de los RTK dirigidos con una cantidad limitada de muestras resulta extremadamente útil ya que el éxito de las terapias dirigidas se basa en la capacidad del fármaco de desactivar (o desfosforilar) los RTK diana. Además, dicho principio puede aplicarse a la investigación de otras moléculas de rutas de transducción de señales para una mejor selección de la terapia y un seguimiento efectivo de la enfermedad entre las opciones disponibles de tratamiento del cáncer. Debido a que el perfil de la enfermedad con frecuencia cambia en el cáncer de mama recurrente, este formato de ensayo único puede utilizarse para proporcionar información clínica valiosa con un número limitado de muestras obtenidas de una "enfermedad cambiante" para ayudar al oncólogo a ajustar las opciones de tratamiento de la enfermedad para cada paciente según un cambio "personal" del perfil del cáncer.

Ejemplo 20. Método para detectar la activación de los receptores de tirosina quinasa en células tumorales circulantes utilizando un inmunoensayo en micromatriz mediado por proximidad.

Antecedentes: la activación anormal de HER1 y HER2 se ha asociado a diversos tipos de progresión del cáncer, y los cambios en el estatus de expresión de tumor primario a células tumorales circulantes (CTC) se ha informado que se producen con una frecuencia significativa. Los métodos para detectar la fosforilación de HER1 y HER2 en CTC recogidas en serie podría proporcionar información valiosa sobre el cambio de perfil global de la enfermedad y por lo tanto conducir a selecciones/ajustes mejores de la terapia.

Métodos: se ha desarrollado una plataforma micromatriz multiplex de proteínas con triple canalización de anticuerpo-enzima para detectar la fosforilación de las moléculas diana. Esta plataforma micromatriz multiplex de proteínas utiliza una formación única de complejo inmunológico mediante colocalización de dos anticuerpos conjugados con enzima detector tras la captura de las proteínas diana sobre la superficie de la micromatriz. Los sucesos de canalización entre los dos enzimas detectores en proximidad permite el perfilado de los receptores de tirosina quinasa (RTK) con sensibilidad al nivel de células individuales. La especificidad de detección de dianas fosforiladas se incrementa en gran medida dado el requisito de unión simultánea de tres anticuerpos. Con el fin de validar el método en muestras clínicas, se llevaron a cabo ensayos con CTC activadas procedentes de 75 pacientes de cáncer sometidos a diversos regímenes de terapia.

Resultados: los presentes inventores identificaron 6 pacientes (8%) con HER1 activado, 6 pacientes (8%) con HER2 activado y 14 (18,5%) pacientes con doble activación de RTK en sus CTC. 25 muestras normales mostraron una activación no detectable de HER1/HER2. Los presentes inventores también observaron discrepancias entre el estatus de activación de HER2 entre las CTC y su estatus IHQ del HER2 primario correspondiente entre pacientes de cáncer de mama. Se encontraron CTC con HER2 activado en 6 pacientes de entre 16 (38%) cánceres de mama primarios negativos para HER2. Además, 2 de 5 (40%) pacientes positivos para HER2 presentaba CTC sin activación aparente de HER2.

Conclusión: la plataforma multiplexada mediada por proximidad proporciona ventajosamente sensibilidad al nivel de células individuales para detectar la activación de las RTK en una cantidad limitada de muestra. De esta manera, pueden obtenerse y perfilarse las CTC presentes en los cánceres en estadio metastásico para obtener información valiosa con impacto en la práctica clínica.

Ejemplo 21. Método para detectar la activación de los receptores de tirosina quinasa en lesiones metastásicas utilizando un inmunoensayo en micromatriz mediado por proximidad.

Antecedentes: los cambios en el estatus de expresión de los receptores tumorales de sitio primario a lesiones metastásicas es conocido de la técnica que ocurren a una frecuencia significativa (~15% a 20%). En consecuencia, los métodos de perfilado de los patrones de activación de los receptores de tirosina quinasa (RTK) en tumores metastásicos podrían proporcionar información valiosa sobre la cambiante patogénesis de la enfermedad.

Métodos: se ha desarrollado una nueva tecnología capaz de detectar específicamente sucesos de fosforilación en las RTK de la familia de ErbB. Esta plataforma micromatriz multiplex de proteínas utiliza una formación única de complejo inmunológico mediante colocalización de dos anticuerpos conjugados con enzima detector tras la captura de las proteínas diana sobre la superficie de la micromatriz. Los sucesos de canalización entre los dos enzimas detectores (por ejemplo la glucosa oxidasa y la peroxidasa de rábano picante) en proximidad permite el perfilado de

las RTK con una sensibilidad extrema. De hecho, la especificidad analítica resulta muy mejorada dado el requisito de unión simultánea de tres anticuerpos diferentes. Los presentes inventores utilizaron 29 tejidos de cáncer de mama (estadios II a IV) como sistema modelo para el perfilado de RTK mediante aspirado metastásico con aguja fina (AGFm).

5 Resultados: las muestras de tejido tumoral recogidas utilizando agujas de calibre G23 se lisaron en 100 ml de tampón de lisis y las muestras solubles (que contenían ~100 a 200 mg de proteína) se analizaron para el estatus de activación de RTK. De 29 muestras de AGF, 27% (8/29) mostraron HER2 altamente activado y 2 muestras (6%) mostraron un nivel intermedio de HER2 activado. Una de las muestras con activación intermedia de HER2 también
10 mostró un nivel intermedio de activación de HER1. Dos de las 8 muestras con HER2 activado también mostraron un nivel significativo de activación de HER1. Entre las 19 muestras negativas para HER2 activado, 3 mostraron un nivel moderado de activación de HER1.

15 Conclusión: la plataforma multiplexada mediada por proximidad proporciona ventajosamente sensibilidad al nivel de células individuales para detectar sucesos diana de fosforilación de las RTK en una cantidad limitada de muestra de tejido AGFm. La capacidad de perfilar tumores en diferentes sitios metastásicos proporciona, por lo tanto, información valiosa sobre los diferentes potenciales de metástasis. De esta manera, las muestras de AGFm de pase único mínimamente invasivas pueden utilizarse para ajustar las opciones de terapia a los cambios de perfil de la enfermedad.

20 Aunque la invención anterior ha sido descrita en cierto detalle a título de ilustración y ejemplo en aras de la claridad de comprensión, resultará fácilmente evidente para el experto ordinario en la materia a la luz de las enseñanzas de la presente invención que pueden realizarse determinados cambios y modificaciones a la misma sin apartarse del alcance según las reivindicaciones adjuntas.

25

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar la presencia de un receptor truncado p95ErbB2, utilizando una matriz, comprendiendo dicho método:
 - (a) incubar un extracto celular con una pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (DEC) de un receptor de ErbB2 (HER-2) de longitud completa e incubar dicho extracto celular con una pluralidad de anticuerpos de captura, en el que dicha pluralidad de anticuerpos de captura es específica para una región de unión a dominio intracelular (DIC) de dicho receptor truncado y en el que dicha pluralidad de anticuerpos de captura está inmovilizada sobre un soporte sólido en la matriz formando una pluralidad de receptores truncados capturados,
 - (b) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección específicos para los receptores truncados correspondientes formando una pluralidad de receptores truncados capturados detectables,
 - (c) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un primer y segundo miembros de una pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada, y
 - (d) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros de la pareja de amplificación de señales.
2. Método según la reivindicación 1, en el que los anticuerpos de detección específicos para los receptores truncados correspondientes comprenden una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación y una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación.
3. Método según la reivindicación 2, en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con una fracción facilitadora, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de una pareja de amplificación de señales y la fracción facilitadora genera un agente oxidante que canaliza y reacciona con el primer miembro de la pareja de amplificación de señales.
4. Método según la reivindicación 3, en el que la pluralidad de receptores truncados capturados detectables se incuban con un segundo miembro de la pareja de amplificación de señales para generar una señal amplificada.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (DEC) de un receptor ErbB2 de longitud completa (HER-2) comprende una pareja de estreptavidina-biotina, en el que la estreptavidina está unida a la perla y la biotina está unida a un anticuerpo.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el extracto celular se produce lisando células circulantes de un tumor mamario o mediante el lisado de células aisladas de tejido tumoral.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el tejido tumoral es tejido tumoral primario o tejido tumoral metastásico.
8. Método según la reivindicación 6, en que las células se aíslan a partir de tejido tumoral en forma de una muestra de líquido aspirado con aguja fina.
9. Método según la reivindicación 1 o 2 a 4, en el que se interroga sobre un estado de activación de dicha pluralidad de receptores truncados capturados detectables.
10. Método según la reivindicación 9, en el que el estado de activación se selecciona de entre el grupo que consiste de un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de acomplejamiento y combinaciones de los mismos.
11. Método según la reivindicación 3, en el que la fracción facilitadora es la glucosa oxidasa.
12. Método según la reivindicación 11, en el que la glucosa oxidasa y los anticuerpos independientes del estado de activación se conjugan con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la molécula de dextrano activada por sulfhidrilo presenta un peso molecular de 500 kDa.

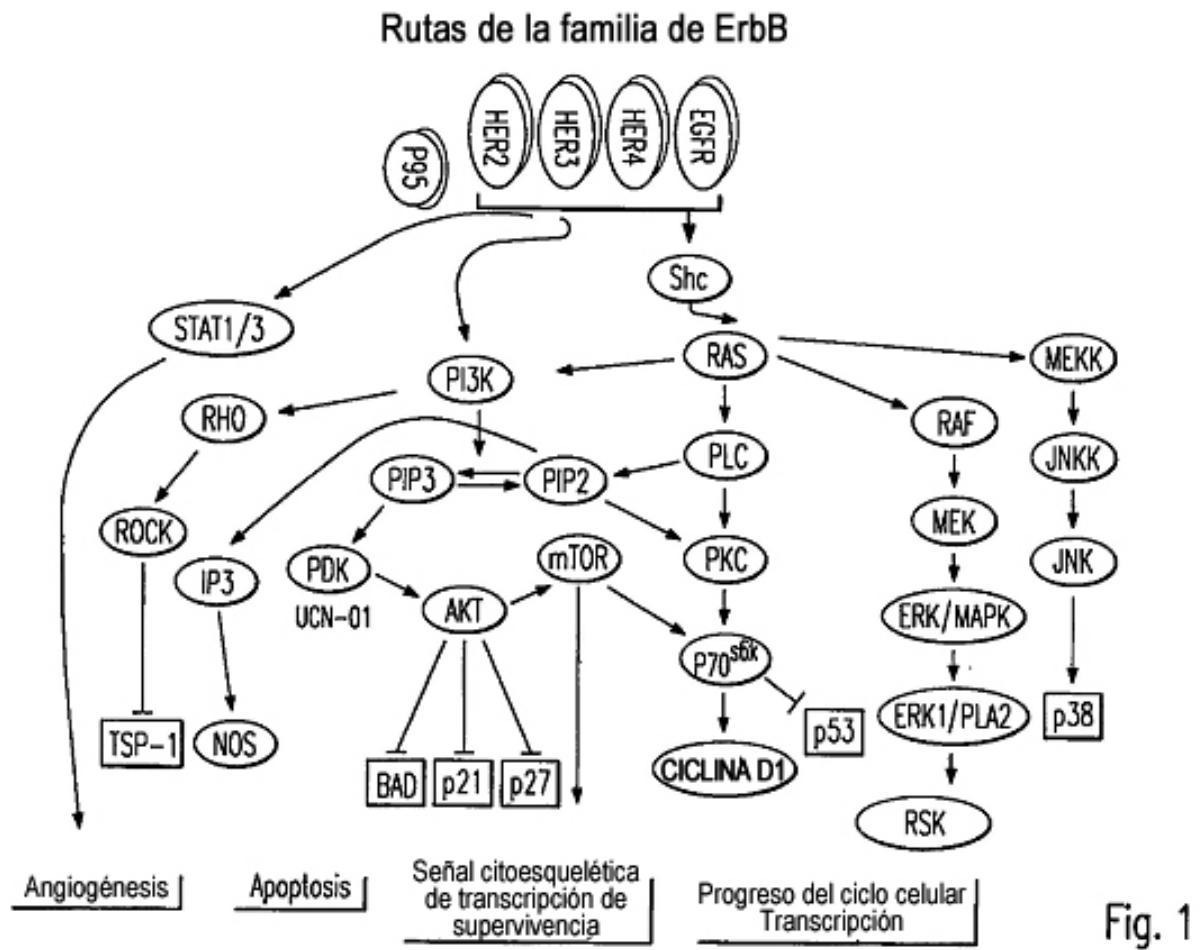


Fig. 1

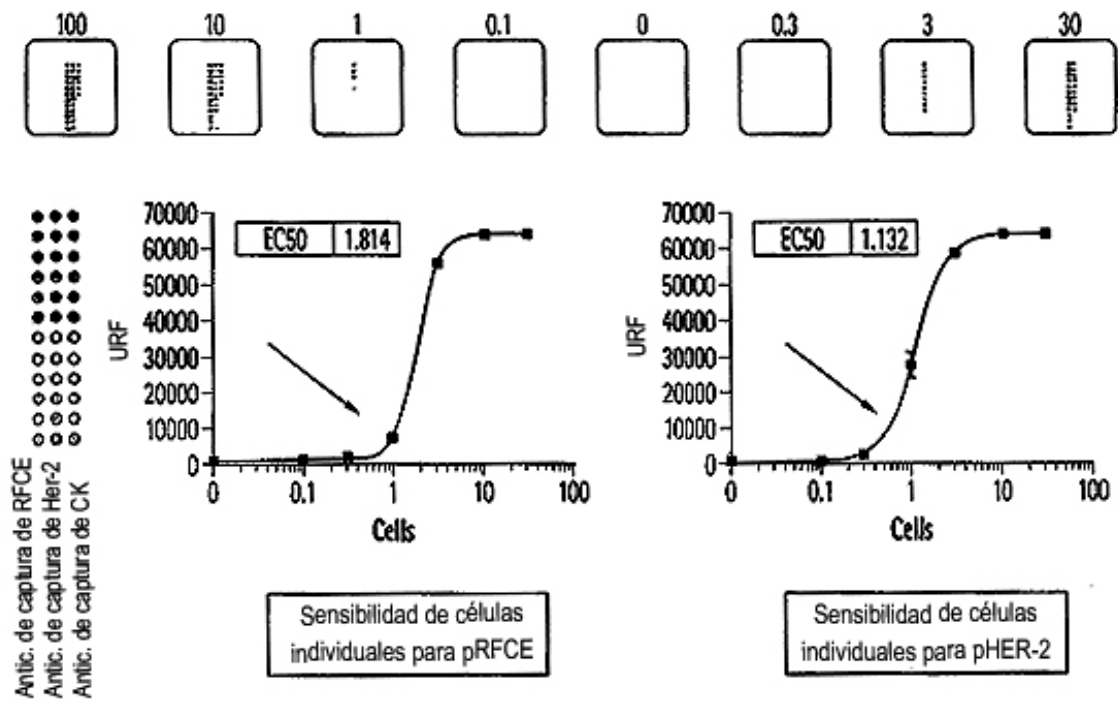
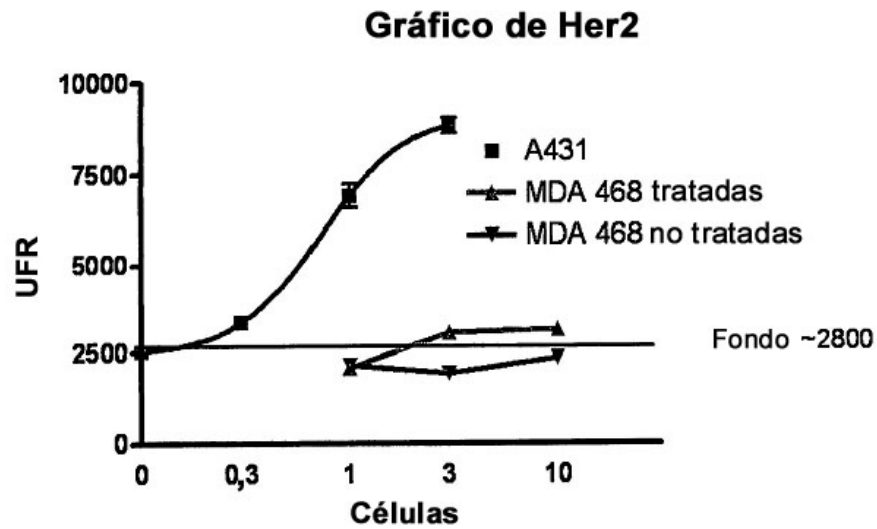


Fig. 2



A431: positivas para HER-1 y HER-2; MD-MBA 468: sólo positivas para HER-1

FIG. 3

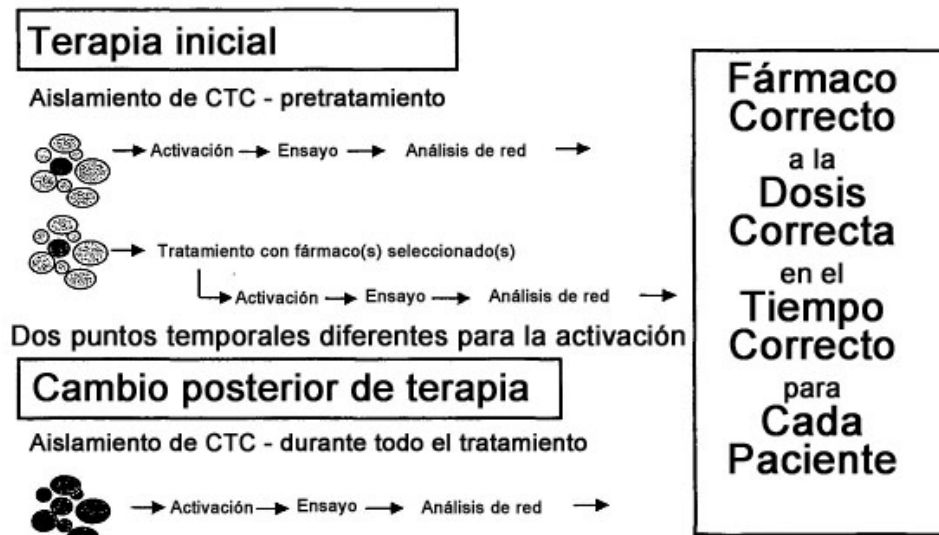


Fig. 4

Chip de rutas de RTK

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A		RE	RE(SER167)					AlB1			N-CoR			RP			IGF1R			
B		(det w/Ser118)																		
C																				
D																				
E		cMET	ErbB1		ErbB2		P95ErbB2		ErbB3		ErbB4									
F																				
G																				
H																				
I		Shc	PI3K		Erk		Rsk		Akt		P70S6K									
J																				
K																				
L																				
M		Ki67	TOP0 II																	
N																				
O																				
P																				
Q																				
R																				
S																				
T																				

Fig. 5

Chip de angiogenesis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A																				
B																				
C																				
D																				
E																				
F																				
G																				
H																				
I		Shc			PI3K			Erk			Rsk			Akt			P70S6K			
J																				
K																				
L																				
M		Ki67			TOPO II			VEGFR1			VEGFR2			Tie2			V-Cadherin-R2			
N																				
O																				
P																				
Q		PDGFRa			PDGFRb						CK Cont			Assay Cont			Printing Cont			
R																				
S																				
T																				

Fig. 6

Chip de angiogénesis alternativo

[illegible]

Fig. 7

Chip combinado

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A		RE		RE(SER167)				AIB1		N-CoR		RP		IGF1R						
B		(det w/Ser118)																		
C																				
D																				
E		cMET		ErbB1		ErbB2		P95ErbB2		ErbB3		ErbB4								
F																				
G																				
H																				
I		Shc		PI3K		Erk		Rsk		Akt		P70S6K								
J																				
K																				
L																				
M		Ki67		TOPO II		VEGFR1		VEGFR2		Tie2		V-Cadherin-R2								
N																				
O																				
P																				
Q		RFCDPa		RFCDPb						CK Cont		Ensayo Cont		Impresión Cont						
R																				
S																				
T																				

Fig. 8

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A			RE		RE(SER118)			RE(SER167)			RE-AIB1			RE-N-CoR			RFCE			
B																				
C																				
D			RP		IGF1R			Shc			PI3K			Erk			ErbB2			
E																				
F																				
G																				
H																				
I			Rsk		Akt			P70S6K			Ki67			TOP2 II			P95ErbB2			
J																				
K																				
L																				
M			VEGFR1		VEGFR2			Tie2			Cadherina V-R2			RFCDP			ErbB3			
N																				
O																				
P																				
Q			RFCDPb		CK Cont			Ensayo cont.						Impresión Cont.			ErbB4			
R																				
S																				
T																				

Fig. 9

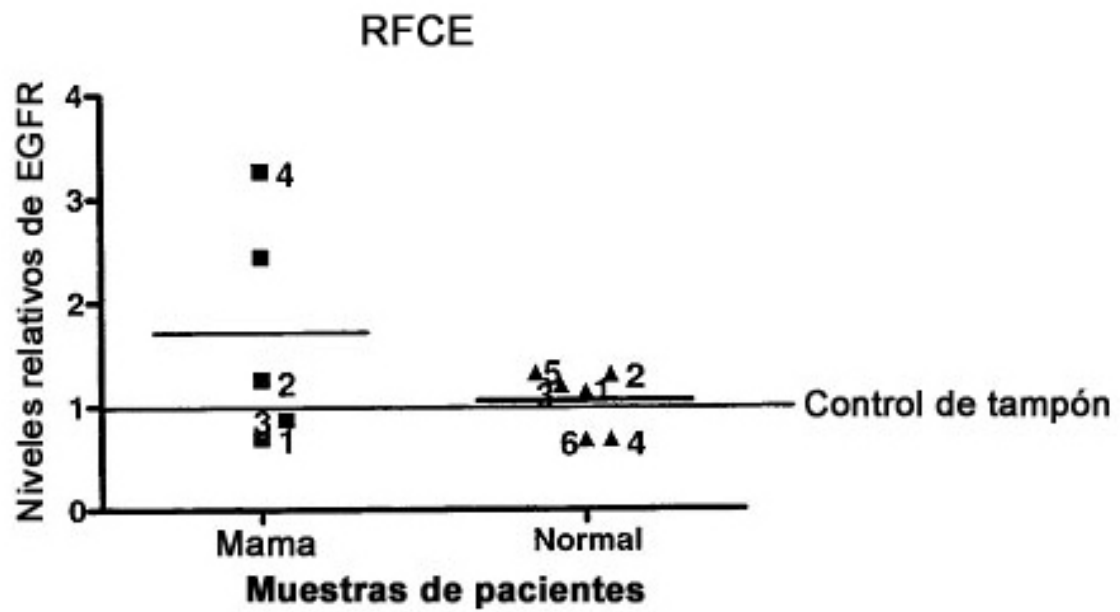


FIG. 10

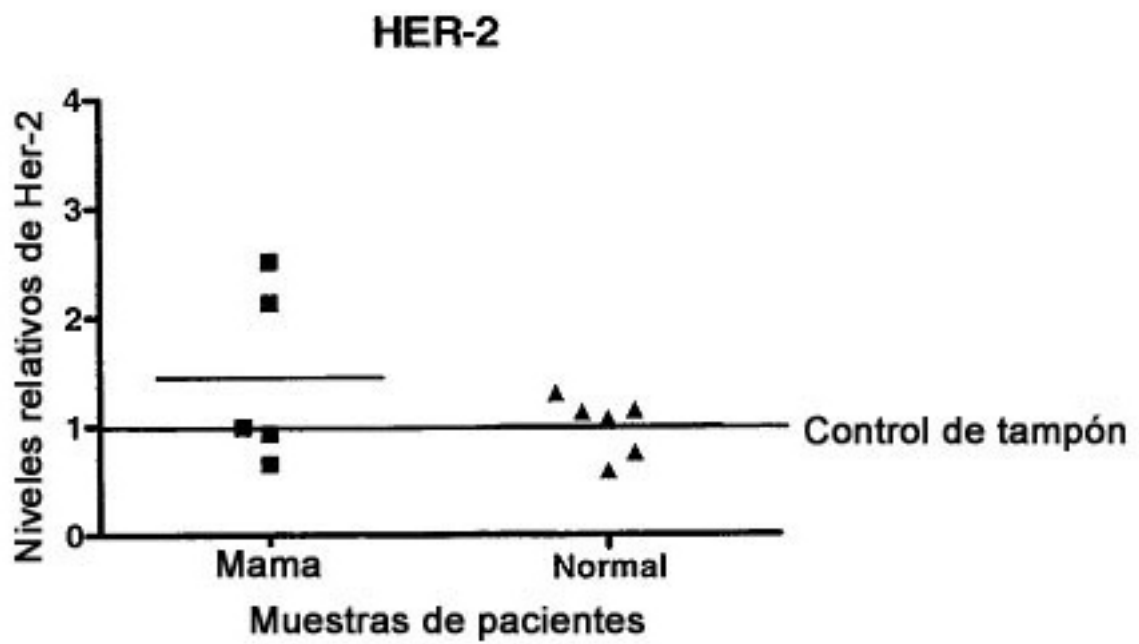


FIG. 11

	A431	SKBR3	01-003 BCA	01-006 BCA	01-019 BCA	01-014 BCA	02-017 BCA
RFCE			0 -	1 +	0 -	3 +	3 +
CK			1	1	4	3	3
CK + DAPI			1	1	4	3	3

FIG. 12

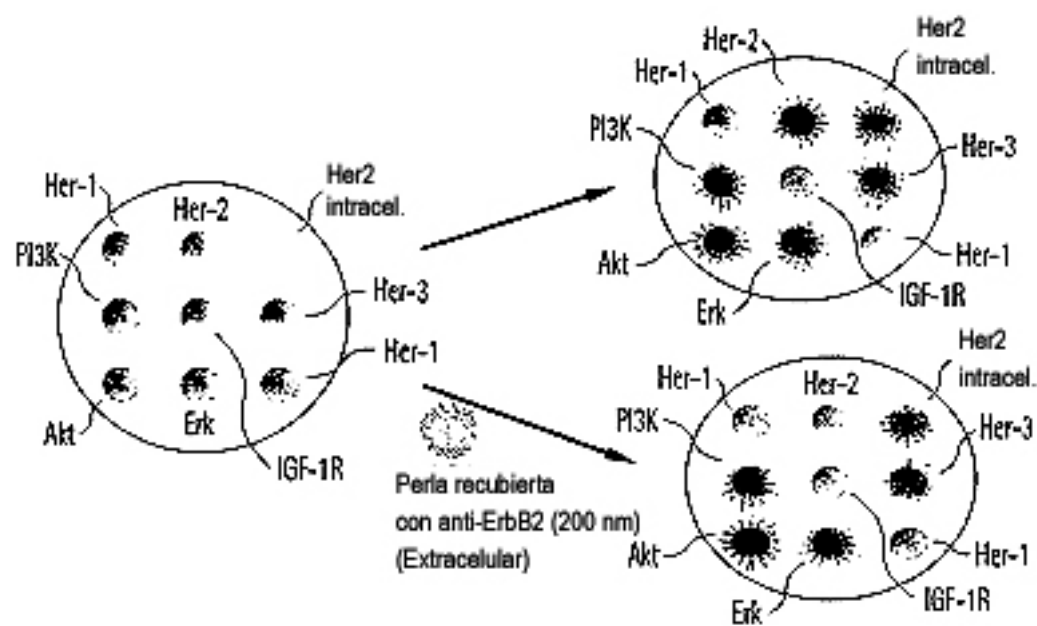


Fig. 13

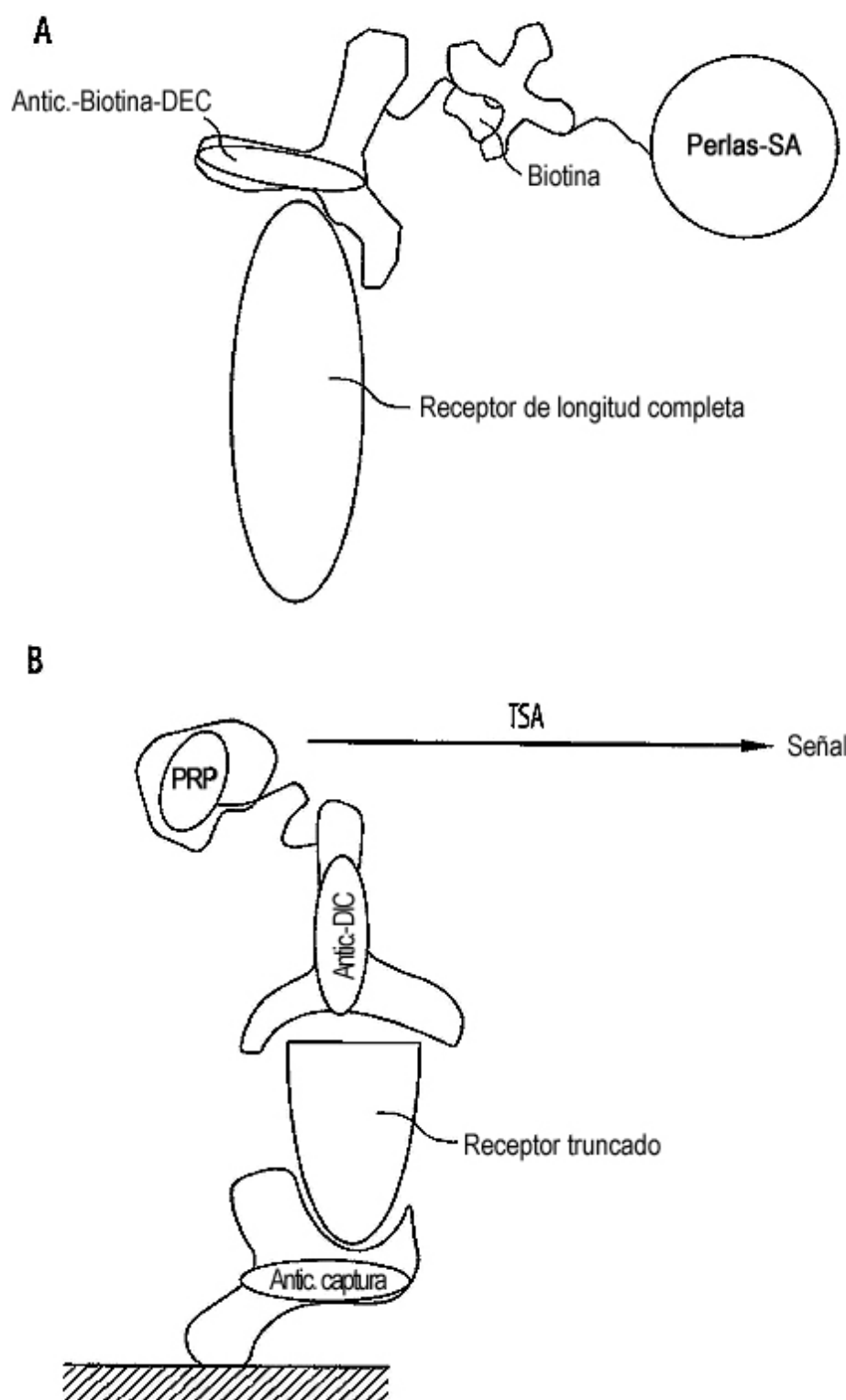


Fig. 14

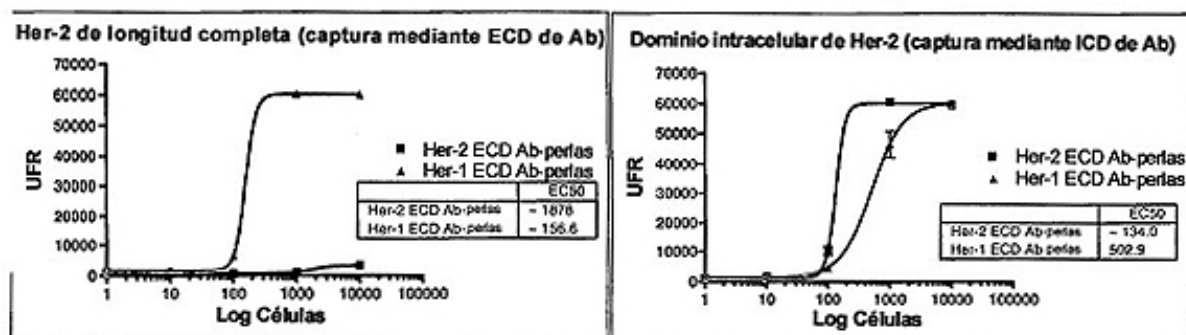


FIG. 15

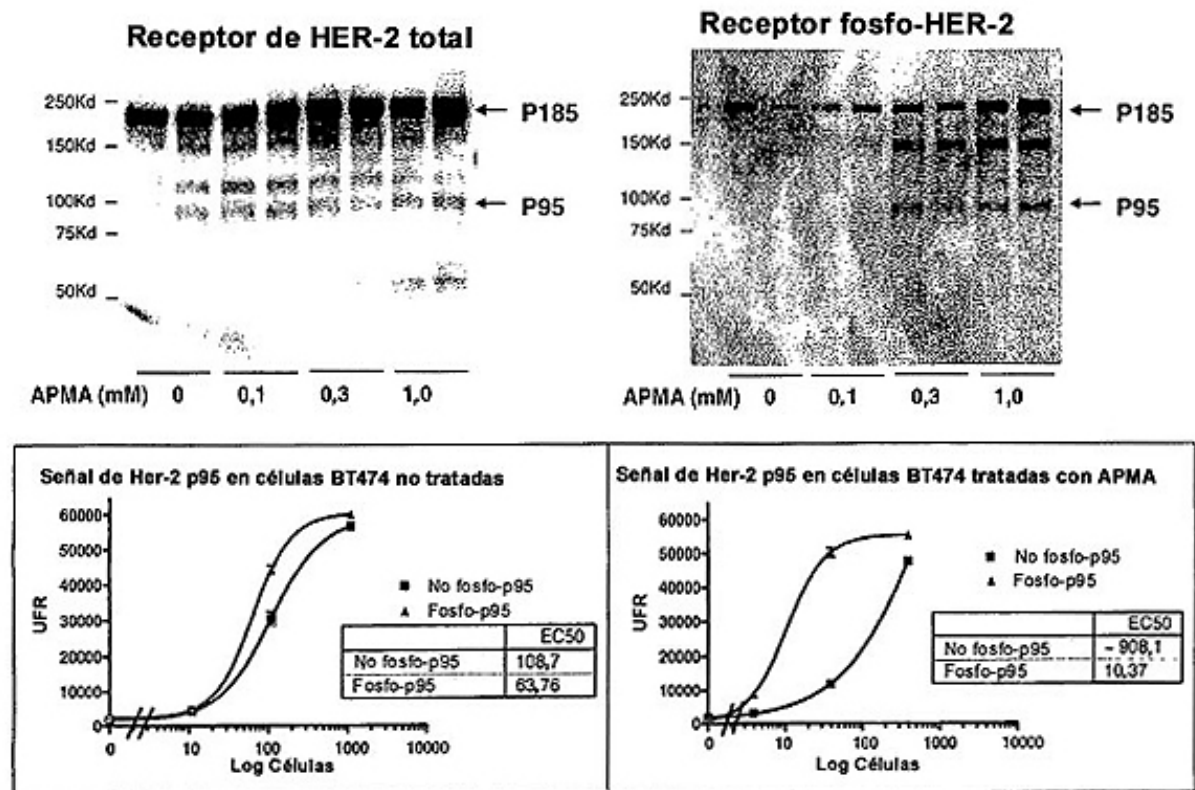


FIG. 16

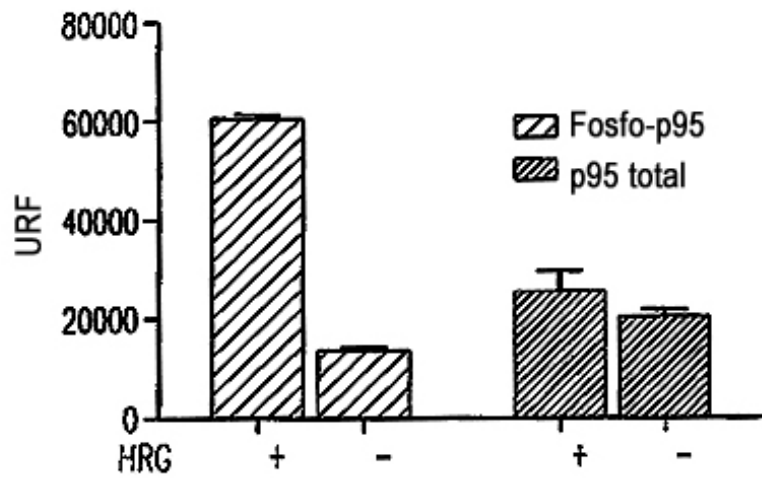


Fig. 17

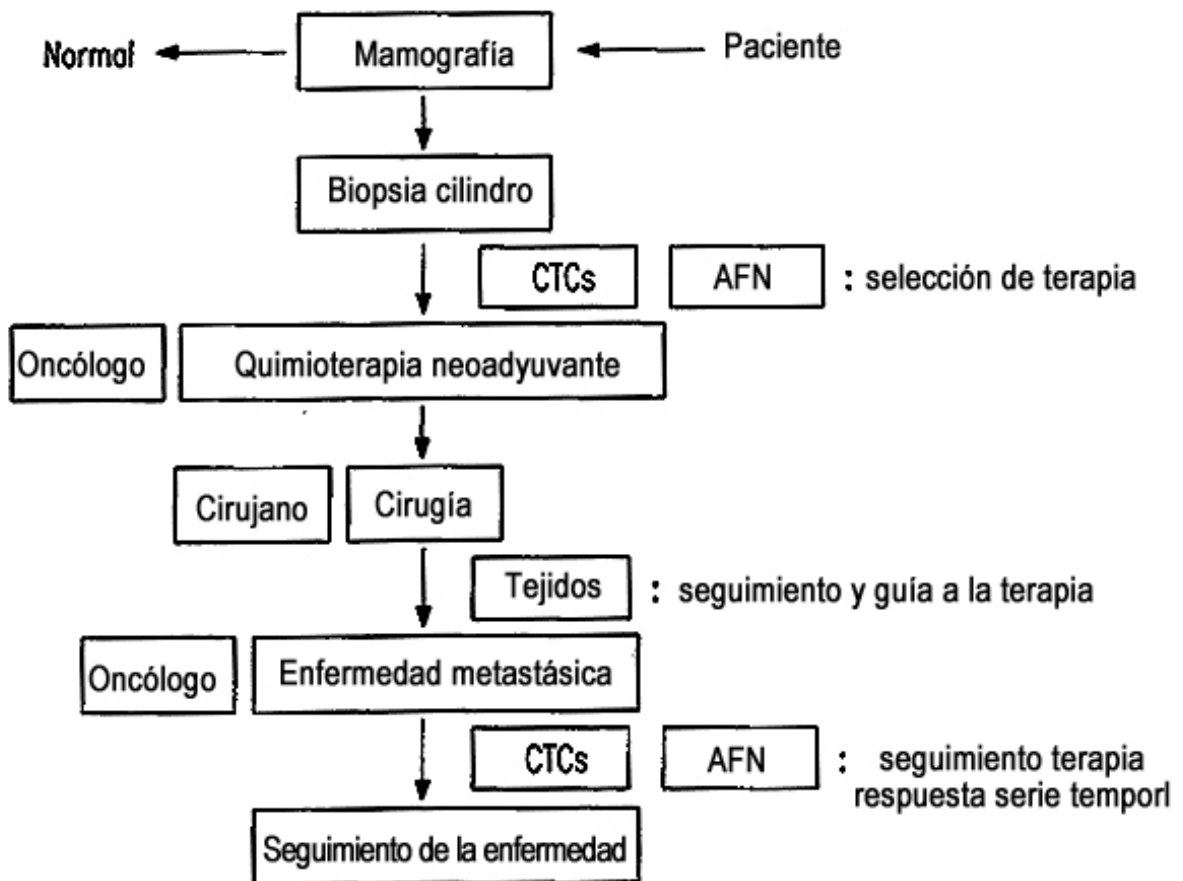


Fig. 18

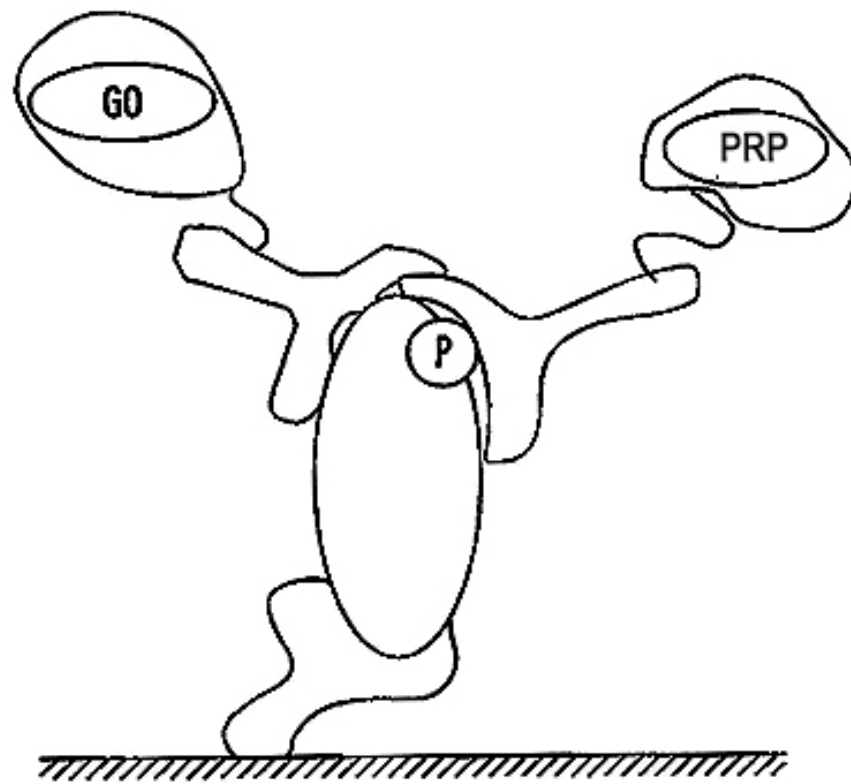


Fig. 19

	SKBR3		T47D		BT-474		MDA-MB-468	
pHER2							pHER1	
HER2							HER1	
EGF	-	+	-	+	-	+	EGF	-
pHER2							pHER1	
HER2							HER1	
HRGβ	-	+	-	+	-	+	HRGβ	-

FIG. 21



Fig. 22

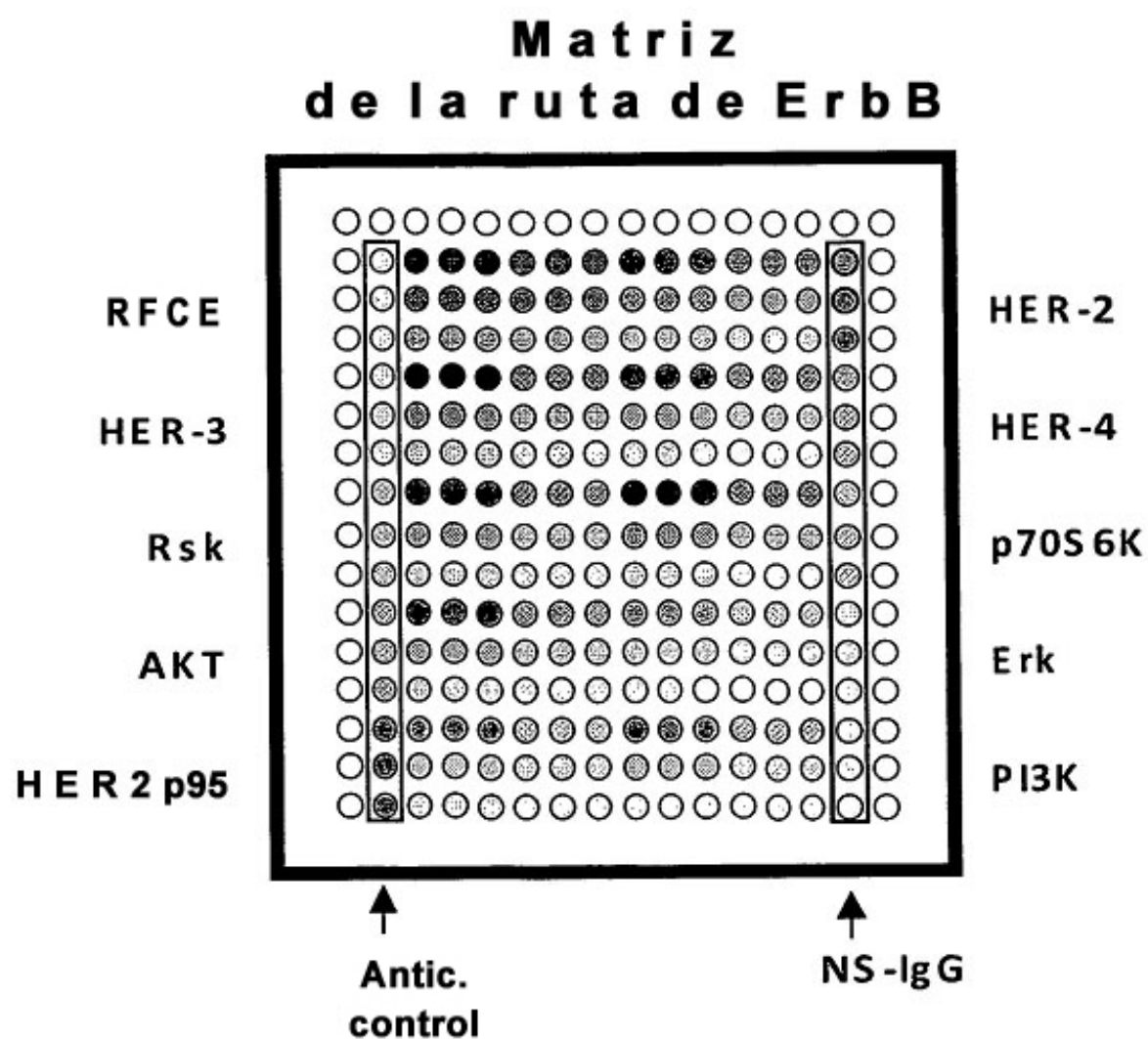


Fig. 23