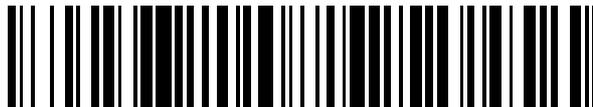


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 587 054**

51 Int. Cl.:

A61M 1/02 (2006.01)

A61M 1/34 (2006.01)

B01L 3/14 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2012 PCT/US2012/025491**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12154257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2012 E 12707194 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2675494**

54 Título: **Aparato y método para aislar leucocitos y células tumorales mediante filtración**

30 Prioridad:

17.02.2011 US 201161444044 P
25.05.2011 US 201161489998 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SINGH, SHARAT;
LIU, XINJUN y
HESTER, KELLY D.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 587 054 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

Aparato y método para aislar leucocitos y células tumorales mediante filtración

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. Existe una creciente necesidad de análisis precisos de marcadores oncogénicos para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer. Por ejemplo, la detección de una matriz de marcadores oncogénicos podría permitir al médico detectar el cáncer en estadio temprano y realizar un seguimiento de la progresión del cáncer. Con un conocimiento sobre la capacidad de respuesta del paciente a las terapias anticáncer antes del inicio de la medicación, el médico podría seleccionar el mejor curso de tratamiento para cada paciente individual. Además, el análisis rutinario de la eficacia del fármaco durante el curso del tratamiento podría revelar la falta de respuesta de un paciente a fármacos anticáncer específicos. Dicha información podría utilizarse para mejorar la selección de regímenes de tratamiento farmacológico.

15 Los métodos actuales de análisis de marcadores oncogénicos se basan en interrogar células malignas en una mezcla heterogénea de células normales y de cáncer, tal como sangre completa. Algunos métodos tales como el sistema de aislamiento de ARN total LeukoLOCK (Ambion) capturan células malignas circulantes de la sangre completa pasando una muestra de sangre a través de filtros desechables de reducción de leucocitos. Típicamente, estos filtros de leucodepleción se enjuagan con tampones tales como PBS, recuperando las células malignas. Esta etapa de lavado modifica la concentración intracelular de fármacos anticáncer a los que previamente se han expuesto las células, posiblemente provocando de esta manera respuestas de señalización *de novo* dentro de las células y alterando la expresión de los marcadores oncogénicos. En consecuencia, la expresión de los marcadores oncogénicos en la muestra analizada podría reflejar de manera imprecisa la respuesta de un paciente a terapias anticáncer específicas. Lo anterior podría conducir a evaluaciones diagnósticas y/o pronósticas incorrectas. La presente invención supera dicha potencial fuente de error mediante la provisión de métodos y aparatos para aislar un subgrupo de células sanguíneas sin modificar la concentración intracelular de un fármaco anticáncer.

30 El documento n° WO 02/24256 se refiere a un dispositivo de filtración con varios medios de filtración y una bolsa que comprende los mismos. La patente n° EP0616816 se refiere a métodos para separar un material sanguíneo en productos de componente sanguíneo. La patente n° US4915848 se refiere a un sistema de filtración de glóbulos rojos. La patente n° EP14241631 se refiere a un dispositivo de separación para el tratamiento de moléculas biológicas. La patente n° EP2260943 se refiere a un tubo de centrifuga de microfiltración.

35 BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

40 La presente invención proporciona aparatos y métodos para aislar, recolectar y/o recuperar un subgrupo de células sanguíneas, tales como leucocitos normales, leucocitos enfermos, leucocitos malignos, células de leucemia, células espumosas y/o células tumorales circulantes (CTC) a partir de una muestra de sangre mediante filtración sin modificar la concentración intracelular (*in vivo*) de un agente terapéutico, es decir, un fármaco anticáncer (por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa). En determinados aspectos, la presente invención proporciona aparatos de aislamiento celular que comprenden un dispositivo de filtración y un tubo de recolección.

45 En un aspecto, la presente invención proporciona un aparato para aislar y separar leucocitos a partir de glóbulos rojos en una muestra de sangre completa, comprendiendo el aparato:

50 un dispositivo de filtración que comprende una cámara superior, una cámara inferior y una o más membranas de filtración apiladas entre las cámaras superior e inferior, en el que una o más membranas de filtración apiladas son capaces de retener los leucocitos, y un tubo de recolección para recolectar los glóbulos rojos a partir de la muestra de sangre completa, en el que el dispositivo de filtración se aplica sobre la parte superior del tubo de recolección y en el que los glóbulos rojos se separan los leucocitos y se recolectan en el tubo de recolección tras la centrifugación. En un aspecto preferente, la cámara inferior se dispone entre la cámara superior y el tubo de recolección.

55 En otra realización, la presente invención proporciona un método para preparar un lisado de leucocitos a partir de una muestra de sangre completa sin dilución sustancial de un agente terapéutico (por ejemplo un fármaco anticáncer), comprendiendo el método:

60 (a) cargar la muestra de sangre completa en un aparato de aislamiento (filtración) celular, tal como un aparato tal como se indica en la presente memoria,
 (b) centrifugar el aparato para capturar los leucocitos sobre la membrana o membranas de filtración apiladas con el fin de separar los glóbulos rojos en un tubo de recolección, y
 (c) lisar los leucocitos capturados sobre la membrana o membranas de filtración apiladas con tampón de lisis aunque sin una etapa de lavado entre las etapas (b) y (c) para preparar de esta manera un lisado de leucocitos.

65 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el seguimiento de la eficacia de un fármaco anticáncer en un sujeto, en el que el sujeto presenta una neoplasia hematológica maligna, que comprende:

administrar el fármaco anticáncer en el sujeto, en el que la primera administración del fármaco anticáncer se realiza en un tiempo T₁; medir el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL en un tiempo T₂ en una muestra del sujeto, y determinar un curso de tratamiento basándose en el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL.

5 En determinadas realizaciones, el método comprende además medir el estado de activación de BCR-ABL en T₀, es decir, antes de la primera administración del fármaco anticáncer. En determinados casos, la neoplasia hematológica maligna es un linfoma o una leucemia, tal como leucemia mielógena crónica (LMC). La diferencia temporal entre T₁ y T₂ es de entre aproximadamente 1 semana y aproximadamente 6 meses, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 10 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 semanas. La diferencia temporal entre T₀ y T₁ es de entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 3 semanas. En otros aspectos determinados, los métodos incluyen además medir los niveles de expresión y/o activación de por lo menos otra molécula de transducción de señales, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC.

15 En determinados aspectos, el curso del tratamiento se selecciona de entre modificar la dosis de fármaco anticáncer, modificar el fármaco anticáncer, incluyendo un fármaco anticáncer adicional, modificar la duración del tratamiento y permanecer en el curso de tratamiento preexistente.

20 En determinados aspectos, la muestra comprende un extracto de células aisladas. En determinados aspectos, las células aisladas se incuban *in vitro* con por lo menos un fármaco anticáncer (por ejemplo 2 fármacos anticáncer) en T₀ (antes del inicio del tratamiento). En otros casos, las células aisladas se incuban *in vitro* con por lo menos dos fármacos anticáncer en T₂, antes de determinar el curso del tratamiento.

25 En todavía otra realización, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer en un sujeto que presenta una neoplasia hematológica maligna:
medir el nivel de estado de activación de BCR-ABL en una célula aislada de una muestra del sujeto, incubar la célula aislada con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento, medir el nivel de estado de activación de BCR-ABL en las células incubadas, y seleccionar un curso de tratamiento basándose en el nivel de estado de activación de BCR-ABL.

30 En determinados aspectos, el curso de tratamiento se selecciona de entre el grupo que consiste de selección de fármaco anticáncer, selección de la dosis anticáncer y determinación de la duración del tratamiento. En otros aspectos determinados, los métodos incluyen además medir los niveles de expresión y/o activación de por lo menos otra molécula de transducción de señales, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC.

35 De esta manera, la presente invención proporciona: un método para seleccionar un fármaco anticáncer en un sujeto que presenta una neoplasia hematológica maligna, comprendiendo el método:

40 1) medir el nivel de estado de activación de BCR-ABL en una célula aislada de una muestra del sujeto, 2) incubar la célula aislada con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento, 3) medir el nivel de estado de activación de BCR-ABL en las células incubadas, y seleccionar un curso de tratamiento basándose en el nivel de estado de activación de BCR-ABL.

45 La presente invención proporciona además un método para el seguimiento de la eficacia de un fármaco anticáncer en un sujeto, en el que el sujeto presenta una neoplasia hematológica maligna, comprendiendo el método:

a) medir el estado de activación de BCR-ABL en T₀, antes de la primera administración del fármaco anticáncer, b) administrar el fármaco anticáncer en el sujeto, en el que la primera administración del fármaco anticáncer se lleva a cabo en el tiempo T₁, c) medir el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL en un tiempo T₂ en una muestra del sujeto, y d) determinar un curso de tratamiento basándose en el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL.

50 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

55 La FIG. 1 ilustra un diagrama de flujo de una realización de la presente invención.
La FIG. 2A-G ilustra una realización de aparato de aislamiento celular. La FIG. 2A es una realización de una cámara superior. La FIG. 2B-C muestra una cámara superior con tapa; la FIG. 2D-E es una cámara inferior, y la FIG. 2F-G es un tubo de recolección.
60 La FIG. 3A-D ilustra realizaciones de la cámara inferior con diversas funcionalidades de embudo.
La FIG. 4A-D ilustra realizaciones del aparato de aislamiento celular. La FIG. 4A es una realización de las cámaras superior e inferior; la FIG. 4B es una realización de las cámaras superior e inferior; la FIG. 4C es una realización de un tubo de recolección; y la FIG. 4D es una realización de una agregación de una cámara superior, una cámara inferior y un tubo de recolección.
65 La FIG. 5A-D ilustra otra realización del aparato de aislamiento celular. La FIG. 5A es una realización de las

cámaras superior e inferior; la FIG. 5B es una realización de las cámaras superior e inferior con tapa; la FIG. 5C es una realización de un tubo de recolección; y la FIG. 5D es una realización de una cámara inferior y embudo.

La FIG. 6A-C ilustra todavía otra realización del aparato de aislamiento celular. La FIG. 6A es una realización de las cámaras superior e inferior; la FIG. 6B es una realización de las cámaras superior e inferior con una vaina intermedia; la FIG. 6C es una realización de una cámara inferior.

La FIG. 7A-B ilustra que BCR-ABL tanto total como fosforilado pueden detectarse y medirse en lisados celulares preparados a partir de células K562 mediante filtración. Los niveles de BCR-ABL total en las células tras la filtración son similares a los niveles observados en las muestras no filtradas. Además, la FIG. 7B muestra que los niveles de BCR-ABL fosforilado en las células K562 tras la filtración son comparables a los niveles detectados en las células no procesadas.

La FIG. 8A-B ilustra que tanto los niveles de BCR-ABL tanto total (FIG. 8A) como fosforilado (FIG. 8B) pueden detectarse y medirse en lisados celulares, en los que los lisados celulares se preparan a partir de muestras de sangre con adición puntual de células K562, filtradas a través de membranas de filtración y analizadas mediante micromatrices tales como el inmunoensayo mediado por proximidad indicado en la presente memoria. La FIG. 8B muestra que puede compararse el porcentaje de recuperación de BCR-ABL total y fosforilado en diferentes muestras que habían sido centrifugadas a diversas velocidades. El porcentaje más alto de señal de fosfo-BCR-ABL (63,60%) y BCR-ABL total (141,55%) recuperada se obtuvo al utilizar la membrana de filtración PALL y la centrifugación a 600 rpm.

La FIG. 9A-B ilustra que los niveles de BCR-ABL fosforilado (A) pueden detectarse y medirse en lisados celulares preparados a partir de muestras de sangre con adición puntual de cantidades variables de células K562, filtradas a través de membranas de filtración y analizadas mediante micromatrices, tales como el inmunoensayo mediado por proximidad indicado en la presente memoria. Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para detectar los niveles de fosfo-BCR-ABL en muestras con adición de células K562. En particular, los niveles medidos de BCR-ABL fosforilado se refieren al número de células K562 añadidas a las muestras de sangre. La FIG. 9B muestra la recuperación de BCR-ABL total.

La FIG. 10 tabula los pacientes analizados en una realización de la invención. El paciente 1 presenta LMC y ha estado recibiendo tratamiento desde diciembre de 2006. El paciente 2, quien también presenta LMC activa, ha estado recibiendo tratamiento de imatinib desde enero.

La FIG. 11A-B ilustra que el paciente 1: (A) presenta una cantidad menor de fosfo-BCR-ABL por cada ml (por ejemplo 10.979 UC/ml \pm 1.245 UC/ml) de sangre en comparación con el paciente 2 (por ejemplo 185.934 UC/ml \pm 11.019 UC/ml) (B), sugiriendo que el paciente 1 está respondiendo al tratamiento de imatinib. Se determinaron los valores sin restar el nivel de fondo de la sangre.

La FIG. 12A-B muestra la detección de niveles activados (fosforilados) de BCR-ABL determinados mediante los métodos indicados en la presente memoria. Se diluyeron muestras de lisado celular aisladas del paciente 1 1:5 y 1:20 siguiendo los métodos indicados en el Ejemplo 6. La muestra estándar representa lisados de células K562 no tratados con un número variable de células por cada 80 μ l de lisado (por ejemplo 10.000, 3.000, 1.000, 300, 100, 30, 10 o 0 células/80 μ l). El panel superior de la FIG. 12A muestra las imágenes de los ensayos CEER de BCR-ABL.

La FIG. 13A-B muestra que el tratamiento *in vitro* con imatinib de la muestra de sangre del paciente 1 redujo drásticamente la cantidad de BCR-ABL fosforilado en comparación con el tratamiento de nilotinib. La FIG. 13A muestra las imágenes de los ensayos CEER de BCR-ABL.

La FIG. 14 muestra que los niveles de BCR-ABL activado en la muestra de sangre del paciente 1 cambian al tratarlo con cantidades crecientes de inhibidor de BCR-ABL (por ejemplo imatinib o nilotinib). Se incubaron diferentes concentraciones de fármaco con muestras de sangre del paciente 1 durante 1,5 horas a 37°C. El valor de CU medio tras el tratamiento de imatinib 1 μ M fue de 26 y de 110 tras el tratamiento de imatinib 0,1 μ M. El panel superior de la FIG. 13 muestra las imágenes de los ensayos CEER de BCR-ABL.

La FIG. 15A-B muestra que el imatinib resulta más eficaz que el nilotinib en la reducción de la proteína BCR-ABL activada en muestras de sangre del paciente 1. Los gráficos de columnas muestran que el tratamiento de imatinib 1 μ M redujo los niveles de BCR-ABL activado (A) en comparación con la muestra no tratada. La FIG. 15B muestra los resultados tras restar el nivel de fondo de la sangre.

La FIG. 16A-D ilustra el perfil de ruta de otros componentes de la ruta de transducción de señales fosforiladas, tales como CRKL (A), AKT (B), STAT5 (C) y SRC (D). Muestra que la terapia de dasatinib puede reducir los niveles de AKT, STAT4 y SRC activados en muestras de sangre del paciente 1. El tratamiento *in vitro* de muestras de sangre del paciente con dasatinib 1 μ M resultó más eficaz que con imatinib 10 μ M o con nilotinib 10 μ M.

La FIG. 17 muestra que las muestras de sangre del paciente 1 contienen niveles muy elevados de BCR total (aproximadamente 8.000.000 UC/ml).

La FIG. 18A-B ilustra que el nilotinib resulta más eficaz que el imatinib en la reducción de los niveles de BCR-ABL activado en muestras de sangre tratadas *in vitro* procedentes del paciente 2. La FIG. 18A muestra que la incubación *in vitro* de muestras de sangre del paciente 2 con nilotinib 10 μ M resultó ser el tratamiento más eficaz para reducir el % de recuperación de señal de fosfo-BCR-ABL. Los niveles de BCR-ABL fosforilados se detectaron y se midieron tras un tratamiento *in vitro* de muestras de sangre del paciente con diferentes dosis de inhibidores de BCR-ABL durante 1,5 horas a 37°C. La FIG. 18B muestra que las dosis crecientes de nilotinib redujeron el BCR-ABL activado, mientras que el imatinib no presentó ningún efecto sobre las muestras de sangre del paciente 2. El % de recuperación de la señal de fosfo-BCR-ABL se redujo a 39,35% con nilotinib 10 μ M y sólo a 96,46% con imatinib 10 μ M.

La FIG. 19A-D muestra que el tratamiento *in vitro* de muestras de sangre del paciente 2 con dasatinib puede reducir los niveles de CRKL (A), AKT (B), STAT5 (C) y SRC (D) activados. Por otra parte, un tratamiento similar con imatinib o nilotinib reduce únicamente el AKT fosforilado.

5 La FIG. 20A-D muestra que los niveles de CRKL fosforilado pueden detectarse y medirse en varias muestras de sangre del paciente que también había sido tratado con inhibidores de tirosina quinasa *in vitro*. Los inhibidores de BCR-ABL, tales como imatinib y nilotinib, pueden reducir los niveles de CRKL en muestras de sangre del paciente 1 y no del paciente 2. La FIG. 20A-B muestra que el nivel de fosfo-CRKL (UC/ml de sangre) se redujo en las muestras del paciente 1 tratadas *in vitro* con imatinib 10 μ M o con nilotinib 10 μ M, en comparación con las muestras no tratadas. De manera similar, la FIG. 20C-D muestra que en las muestras del paciente 1, el porcentaje de la señal de fosfo-CRKL se redujo con el tratamiento *in vitro*. No se observó una respuesta similar en las muestras del paciente 2.

10 La FIG. 21A-D ilustra que el paciente 1 y el paciente 2 no responden de manera similar al imatinib y al nilotinib. El AKT activado se incrementó en las muestras del paciente 1 tras el tratamiento de imatinib, pero se redujo en las muestras del paciente 2. En respuesta al nilotinib, los niveles de AKT se mantuvieron mayoritariamente sin modificaciones en las muestras del paciente 1 en comparación con las muestras no tratadas, y se incrementaron en gran medida en las muestras del paciente 2. La FIG. 21A-B muestra los resultados calculados como picogramos de AKT activado por cada 1.000 células sometidas a ensayo. La FIG. 21C-D muestra los resultados determinados como porcentaje de señal de AKT recuperada del ensayo CEER.

15 La FIG. 22A-B muestra los perfiles de STAT5 activado de muestras de sangre tratadas *in vitro* del paciente (1) y del paciente 2 (B). El tratamiento de dasatinib redujo los niveles de fosfo-STAT5 en las muestras de los pacientes 1 y 2. El tratamiento de imatinib o nilotinib no modificó el STAT5 activado en la misma medida.

20 La FIG. 23A-D muestra que las muestras tanto del paciente 1 como del paciente 2 presentaban niveles más bajos de fosfo-SRC en respuesta a imatinib, nilotinib y dasatinib. La FIG. 23A-B ilustra los niveles de fosfo-SRC calculados como picogramos por cada 1.000 células sometidas a ensayo. La FIG. 23C-D ilustra los niveles de fosfo-SRC como porcentaje de la señal de fosfo-SRC recuperada.

25 La FIG. 24 representa una lista de pacientes participantes en el presente estudio. Los pacientes fueron diagnosticados con LMC y recibieron tratamiento específico. Se realizó un seguimiento en estos pacientes de las modulaciones *in vivo* de la inhibición de BCR-ABL mediante el ensayo CEER.

30 La FIG. 25 representa una lista de algunos pacientes participantes en el presente estudio. Un asterisco indica una muestra de sangre que se procesó utilizando la realización de tubo del aparato de aislamiento celular de la presente invención. Las otras muestras de sangre se procesaron utilizando la realización de 96 pocillos.

La FIG. 26 ilustra el nivel de expresión de BCR-ABL, BCR y ABL en una muestra de sangre de un sujeto normal y sano.

35 La FIG. 27A-B ilustra los niveles de BCR-ABL activado de los pacientes 1 (A) y 7 (B) en múltiples puntos temporales. GB=glóbulos blancos. pBCR-ABL=fosfo-BCR-ABL. tBCR-ABL=BCR-ABL total. %P/T=fosfo-BCR-ABL/tBCR-ABL en porcentaje.

40 La FIG. 28A-C ilustra el perfil de BCR-ABL del paciente 2 en múltiples puntos temporales. La FIG. 28A muestra que la proporción pBCR-ABL/GB cayó en la sangre extraída el 5/11 y que ya crecía para el 10/12. Un asterisco indica que los datos de pBCR-ABL se ha multiplicado por 10 para que el valor sea visible en el gráfico. La FIG. 28B muestra que la proporción pBCR-ABL/BCR-ABL total alcanzó un mínimo en 5/11. La FIG. 28C muestra los resultados del análisis de RT-PCR cuantitativa utilizando el kit Molecular MD para BCR-ABL y los niveles bajos de ARNm. El porcentaje de BCR-ABL/ABL varía con la cantidad de ARNm presente en la muestra.

45 La fig. 29A-B ilustra el recuento de GB y la proporción pBCR-ABL/GB del paciente 3 en múltiples puntos temporales (A). La FIG. 29B muestra el cambio en los niveles de BCR-ABL total y activado y los porcentajes de ARNm.

La fig. 30A-B ilustra los niveles de BCRA-ABL total y activado del paciente 8 en múltiples puntos temporales (A). La FIG. 30B muestra el cambio en los niveles de BCR-ABL total y activado y los porcentajes de ARNm tras modificar el tratamiento de imatinib a dasatinib.

La fig. 31A-B ilustra los niveles de BCRA-ABL total y activado del paciente 14 (B) y 18 (A) en múltiples puntos temporales.

50 La FIG. 32A-B muestra la respuesta del paciente 14 al tratamiento *in vitro* de imatinib o nilotinib. Los niveles de BCR-ABL total y fosfo-BCR-ABL se redujeron con el tratamiento farmacológico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 I. Introducción

La presente invención proporciona ventajosamente nuevos aparatos y métodos para aislar o recuperar un subgrupo de células sanguíneas, tales como leucocitos normales y/o malignos, células de leucemia, células espumosas y/o células tumorales circulantes (CTC) a partir de muestras de sangre mediante filtración sin modificar la concentración intracelular de un agente terapéutico tal como un fármaco anticáncer (por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa tal como, por ejemplo, mesilato de imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016, Tykerb[®]), canertinib (CI1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (ZACTIMA[™], ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos). Al contrario que en la técnica conocida, los aparatos y métodos de la presente invención proporcionan lisados celulares a partir de células

recuperadas, tales como leucocitos, células de leucemia, células espumosas y/o células tumorales circulantes, sin dilución sustancial de un agente terapéutico, tal como un fármaco anticáncer (por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa).

5 La proteína de fusión BCR-ABL se asocia a la leucemia mielógena crónica (LMC), así como a la leucemia linfoblástica aguda (LLA). En particular, la proteína BCR-ABL es una tirosina quinasa activa que resulta crítica para la patogénesis del cáncer. Aunque el imatinib (Gleevec[®]) actualmente es la terapia de primera línea para pacientes nuevamente diagnosticados con LMC, aproximadamente 20% a 25% de los pacientes no consiguen respuestas citogenéticas completas duraderas. Algunos estudios han demostrado que la reactivación de la actividad de quinasa de BCR-ABL en presencia de un tratamiento continuo de imatinib es la causa principal de la resistencia. De esta manera, la medición de la actividad de BCR-ABL resulta de utilidad en la predicción de la respuesta a la terapia con inhibidores de tirosina quinasa, tales como imatinib, así como en la identificación de pacientes que desarrollan resistencia a dichos inhibidores.

15 En determinadas realizaciones, los aparatos y métodos de la presente invención pueden utilizarse para aislar o recuperar células de interés (por ejemplo leucocitos, células de leucemia, células espumosas y/o células tumorales circulantes) a partir de una muestra, tal como sangre, y preparar lisados a partir de la misma, en la que algunos analitos, tales como, por ejemplo, BCR-ABL, que se encuentran presentes en el lisado celular resultante pueden interrogarse para sus niveles de expresión y/o activación utilizando un ensayo, tal como el inmunoensayo Collaborative Enzyme Enhanced Reactive-immunoassay (CEER[™]) (también conocido como Collaborative Proximity ImmunoAssay (COPIA)). Se describe CEER[™] en los documentos de patente siguientes: documentos n° WO 2008/036802, n° WO 2009/012149, n° WO 2009/108637, n° WO 2010/132723, n° WO 2011/008990 y documento n° PCT/US2010/053386, presentado el 20 de octubre de 2010.

25 En realizaciones particulares, el perfilado de expresión/activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas, sustratos de las mismas y/o otras proteínas de la ruta de transducción de señales (por ejemplo BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1, AKT, SRC, RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, PDGFR, c-Met, c-KIT, IGF-1R, PI3K, etc.) pueden llevarse a cabo en lisados celulares preparados utilizando los aparatos y métodos de la presente invención para determinar la eficacia de la terapia de inhibidores para pacientes con enfermedades mediadas por BCR-ABL (por ejemplo la leucemia mielógena crónica). En algunos casos, los pacientes pueden recibir terapia de inhibidores, tales como el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa, tal como se indica en la presente memoria. En casos particulares, se aíslan células de leucemia a partir de muestras de sangre de dichos pacientes sin dilución sustancial del inhibidor de tirosina quinasa. En determinados otros casos, el perfilado de expresión/activación de las proteínas de fusión oncogénicas y/o componentes de la ruta de transducción de señales en una muestra tras el tratamiento *in vitro* con inhibidores de tirosina quinasa pueden proporcionar información valiosa que permita al médico seleccionar un régimen terapéutico eficaz.

40 A título de ejemplo no limitativo, puede analizarse una muestra de sangre de un paciente que recibe terapia de inhibidor de tirosina quinasa con el fin de determinar la eficacia de la terapia. Puede extraerse sangre del paciente y aislar células de interés, tales como leucocitos, células de leucemia y/o células tumorales circulantes, mediante filtración utilizando los aparatos y métodos de la invención. A continuación, las células se lisan y se interrogan utilizando un ensayo tal como CEER[™] para determinar el efecto del tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa sobre el estado de activación y/o la cantidad total de una o una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL), sustratos de las mismas (por ejemplo sustratos de BCR-ABL, tales como CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV y/o BAP-1) y/o otras moléculas de transducción de señales. En realizaciones particulares, puede determinarse el número de leucocitos, células de leucemia y/o células tumorales circulantes y el perfil de BCR-ABL fosforilado y de otros componentes de la ruta de transducción de señales. La proporción de señales de fosforilación también puede calcularse a partir del análisis y utilizarse para determinar el pronóstico del paciente. En realizaciones particulares, puede llevarse a cabo un seguimiento de la eficacia de la terapia de inhibidores de tirosina quinasa en un paciente mediante la administración de un inhibidor de tirosina quinasa en un tiempo T₁, medir el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL en un tiempo T₂ en una muestra del paciente y determinar un curso de tratamiento basándose en el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL.

55 A título de otro ejemplo no limitativo, una muestra de sangre de un paciente (por ejemplo que no está recibiendo tratamiento de inhibidor de tirosina quinasa) puede incubarse *in vitro* con uno o más inhibidores previamente al aislamiento de leucocitos, células de leucemia y/o células tumorales circulantes (CTC). En casos particulares, se tratan muestras de sangre completa recolectadas de pacientes que han sido diagnosticados con LMC, con uno o más inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo imatinib, nilotinib, dasatinib, etc.). Se aíslan células de interés, tales como células de leucemia, mediante filtración utilizando los aparatos y métodos de la presente invención. A continuación, las células se lisan y se interrogan utilizando un ensayo tal como CEER[™] para determinar el efecto del tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa sobre el estado de activación y/o la cantidad total de una o una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL), sustratos de las mismas (por ejemplo sustratos de BCR-ABL, tales como CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV y/o BAP-1) y/o otras moléculas de

transducción de señales. En realizaciones particulares, puede seleccionarse un inhibidor de tirosina quinasa adecuado para el paciente basándose en la medición del estado o nivel de activación de BCR-ABL en células aisladas de la muestra, incubando las células aisladas con por lo menos un fármaco anticáncer, tal como uno o más inhibidores de tirosina quinasa antes del inicio del tratamiento, midiendo el estado o nivel de activación de BCR-ABL en las células incubadas, y seleccionando un curso de tratamiento basándose en el estado o nivel de activación de BCR-ABL.

II. Definiciones

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

El término "cáncer" incluye cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizada por el crecimiento incontrolado 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 no limitativos de diferentes tipos de cáncer se incluyen neoplasias hematológicas malignas (por ejemplo leucemia y linfoma), sarcomas osteogénicos (por ejemplo sarcoma de Ewing), sarcomas de los tejidos blandos (por ejemplo dermatofibrosarcoma protuberante (DFSP) y rhabdomyosarcoma), otras neoplasias malignas de los tejidos blandos, los carcinomas tiroideos papilares, el cáncer de próstata, el cáncer gástrico (por ejemplo de estómago), el cáncer de mama, el cáncer de pulmón (por ejemplo el cáncer de pulmón de células no pequeñas), los cánceres digestivos y gastrointestinales (por ejemplo el cáncer colorrectal y los tumores estromales gastrointestinales, los tumores carcinoides gastrointestinales, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer anal, el cáncer de los conductos biliares y el cáncer del intestino delgado), 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 coriocarcinomas y los cánceres de cabeza y cuello. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

Una "neoplasia maligna hematológica" incluye cualquier tipo de cáncer que afecta a la sangre, médula ósea y/o nódulos linfáticos. Entre los ejemplos de neoplasias hematológicas malignas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, la leucemia, el linfoma y el mieloma múltiple. Entre los ejemplos no limitativos de diferentes tipos de leucemia se incluyen la leucemia mielógena crónica (LMC), la leucemia linfoblástica aguda (LLA), la leucemia linfocítica crónica (LLC), la leucemia mielógena aguda (LMA) y la leucemia linfocítica granular de células grandes. Entre los subtipos de la LMC se incluyen, por ejemplo, la leucemia monocítica crónica. Entre los subtipos de la LLA se incluyen, por ejemplo, la leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras, la leucemia linfoblástica aguda de células pro-B, la leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras y la leucemia bifenotípica aguda. Entre los subtipos de la LLC se incluyen, por ejemplo, la leucemia prolinfocítica de células B. Entre los subtipos de la LMA se incluyen, por ejemplo, la leucemia promielocítica aguda, la leucemia mieloblástica aguda y la leucemia megacarioblástica aguda. Entre los ejemplos de diferentes tipos de linfoma se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el linfoma de Hodgkin (cuatro subtipos) y el linfoma no de Hodgkin, tales como, por ejemplo, el linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP), el linfoma de células B grandes difuso (LCBGD), el linfoma folicular (LF), el linfoma de células del manto (LCM), la leucemia de células pilosas (LCP), el linfoma de la zona marginal (LZM), el linfoma de Burkitt (LB), el trastorno linfoproliferativo post-trasplante (TLPT), la leucemia prolinfocítica de células T (LPL-T), la leucemia prolinfocítica de células B (LPL-B), la macroglobulinemia de Waldenström (también conocida como linfoma linfoplasmacítico) y otros linfomas de células NK o T.

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 una célula cancerosa, preferentemente una proteína de fusión oncogénica o una molécula de transducción de señales.

El término "transformar" o "transformante" incluye un cambio físico y/o químico de un analito o muestra para extraer el analito o para cambiar o modificar el analito tal como se define en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, una extracción, una manipulación, una precipitación química, un ELISA, un acomplejamiento, una inmunoextracción, una modificación física o química del analito o muestra para medir un nivel o concentración o estado de activación de un analito constituyen todos una transformación. En otras palabras, con la condición de que el analito o muestra no sea idéntico antes y después de la etapa de transformación, el cambio o modificación es una transformación.

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 "proteína de fusión" o "proteína quimérica" incluye una proteína creada mediante la unión de dos o más genes que codifican originalmente proteínas separadas. Dichas fusiones génicas típicamente se generan al sustituir una traslocación cromosómica los exones terminales de un gen por exones intactos de un segundo gen. Lo anterior crea un único gen que puede transcribirse, procesarse y traducirse para producir una proteína de fusión funcional. En realizaciones particulares, la proteína de fusión es una proteína de fusión oncogénica, es decir, una proteína de fusión que participa en la oncogénesis. Entre los ejemplos de proteínas de fusión oncogénicas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR α -PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI1, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TELAML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG y TPR-MET.

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, los receptores tirosina quinasa, tales como RFCE (por ejemplo, RFCE/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), RFCEV1/FLT1, RFCEV2/FLK1/KDR, RFCEV3/FLT4, FLT3/FLK2, RFCDP (por ejemplo, RFCDPA, RFCDPB), 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, c-MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, cadherina V, LTK (tirosina quinasa de leucocitos), ALK (quinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3 y RTK 106; formas truncadas de receptores tirosina quinasa, tales como p95ErbB2; no receptor tirosina quinasa, tales como Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK; componentes de la cascada de señalización de la 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, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, 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), el receptor de progesterona (RP), el receptor de andrógeno, el receptor de glucocorticoide, el receptor de mineralocorticoide, el receptor de vitamina A, el receptor de vitamina D, el receptor de retinoide, el receptor de hormona tiroidea y los receptores huérfanos; coactivadores y represores de receptor nuclear y combinaciones de los mismos.

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, 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 sangre completa o un componente fraccional de la misma, tal como plasma, suero, glóbulos rojos, leucocitos, tales como células mononucleares de sangre periférica y/o células circulantes raras. En realizaciones particulares, la muestra se obtiene mediante aislamiento de leucocitos o 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 una muestra de tejido tumoral, por ejemplo de un tumor sólido.

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

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.

5 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.

10 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
15 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.

20 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 leucocitos o células circulantes raras. 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 proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales sobre un soporte sólido se encuentran disponibles de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA).

30 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 proteínas de fusión oncogénicas o 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, PDGFRA, PDGFRB, Akt, MAPK, PTEN, Raf y MEK se encuentran disponibles de Santa Cruz Biotechnology.

45 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 proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales. En algunas realizaciones, la fosforilación del dominio ABL quinasa de la proteína de fusión BCR-ABL se detecta utilizando un anticuerpo dependiente del estado de activación. En otras 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
50 dependientes del estado de activación.

Entre los ejemplos no limitativos de estados de activación de proteínas de fusión oncogénicas que resultan adecuados para la detección con anticuerpos dependientes del estado de activación se incluyen formas fosforiladas de BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RAR α -PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TELAML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG y TPR-MET. Entre los ejemplos de estados de activación (listados entre paréntesis) de moléculas de transducción de señales que resultan adecuados para la detección con anticuerpos dependientes del estado de activación se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, RFCE (RFCEvIII, fosforilado (p-) RFCE, RFCE:Shc, ubiquitinado (u-) RFCE, p-RFCEvIII); ErbB2 (p95:truncado (Tr)-ErbB2, pErbB2, 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); c-Met (p-c-Met o complejo c-Met/HGF), ER (p-ER (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); HGFRI (p-HGFRI); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRA (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VRFCEI (p-VRFCEI, VRFCEI:PLCg, VRFCE1:Src); VRFCE2 (p-VRFCE2, VRFCE2:PLCy, VRFCE2:Src,
65

5 VRFCE2:heparin sulfato, VRFCE2:VE-cadherina); VRFCE3 (p-VRFCE3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); Tie1 (p-Tie1); Tie2 (p-Tie2); EphA (p-EphA); EphB (p-EphB); NFKB y/o IKB (p-IK (S32), p-NFKB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad: 14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (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)).

10 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 proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales.

15 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.

20 La expresión "inhibidor de tirosina quinasa" incluye cualquiera de entre una diversidad de agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de receptor y/o no receptor tirosina quinasa. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, los inhibidores de tirosina quinasa generalmente inhiben las tirosina quinasa diana mediante la unión al sitio de unión a ATP del enzima. Entre los ejemplos de inhibidores de tirosina quinasa se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, imatinib (Gleevec[®]; STI571), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]; SU11248), erlotinib (Tarceva[®]; OSI1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24534), derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos. Se describen inhibidores adicionales de tirosina quinasa para la utilización en la presente invención en, por ejemplo, las patentes US n° 5.618.829, n° 5.639.757, n° 5.728.868, n° 5.804.396, n° 6.100.254, n° 6.127.374, n° 6.245.759, n° 6.306.874, n° n° 6.313.138, n° 6.316.444, n° 6.329.380, n° 6.344.459, n° 6.420.382, n° 6.479.512, n° 6.498.165, n° 6.544.988, n° n° 6.562.818, n° 6.586.423, n° 6.586.424, n° 6.740.665, n° 6.794.393, n° 6.875.767, n° 6.927.293 y n° 6.958.340. El experto en la materia conocerá otros inhibidores de tirosina quinasa adecuados para la utilización en la presente invención. En determinados casos, el inhibidor de tirosina quinasa se administra en una forma farmacéuticamente aceptable, incluyendo, aunque sin limitación, una sal de metal alcalino o alcalino-térreo, tal como una sal de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio o cinc; una sal amónico, tal como una sal de amina terciaria o de amonio cuaternario, y una sal de ácido, tal como succinato, tartrato, bitartrato, dihidrocloruro, salicilato, hemisuccinato, citrato, isocitrato, malato, maleato, mesilato, hidrocloreuro, hidrobromuro, fosfato, acetato, carbamato, sulfato, nitrato, formato, lactato, gluconato, glucuronato, piruvato, oxalacetato, fumarato, propionato, aspartato, glutamato o benzoato.

25 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.

30 La expresión "curso de terapia" incluye cualquier enfoque terapéutico que se sigue para aliviar o prevenir uno o más síntomas asociados a un cáncer, tal como una neoplasia hematológica maligna (por ejemplo leucemia, linfoma, etc.). La expresión comprende administrar cualquier compuesto, fármaco, procedimiento y/o régimen útil para mejorar la salud de un individuo con cáncer e incluye cualquiera de los agentes terapéuticos indicados en la presente memoria. El experto en la materia apreciará que el curso de terapia o la dosis del curso de terapia actual puede modificarse (por ejemplo incrementarse o reducirse) basándose en la presencia y/o niveles de activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales determinados utilizando los métodos de la presente invención.

60 III. Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona ventajosamente nuevos aparatos y métodos para aislar o recuperar un subgrupo de células sanguíneas, tales como, por ejemplo, leucocitos (por ejemplo leucocitos normales y/o malignos), células de leucemia, células espumosas y/o células tumorales circulantes (CTC) a partir de muestras de sangre mediante filtración sin modificar la concentración intracelular de un agente terapéutico tal como un fármaco anticáncer (por

ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa tal como, por ejemplo, mesilato de imatinib (Gleevec®), nilotinib (Tasigna®), dasatinib (Sprycel®), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW572016, Tykerb®), canertinib (CI1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), leflunómido (SU101), vandetanib (ZACTIMA™, ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos). Al contrario que en la técnica conocida, los aparatos y métodos de la presente invención proporcionan lisados celulares a partir de células recuperadas, tales como leucocitos, células de leucemia, células espumosas y/o células tumorales circulantes, sin dilución sustancial de un agente terapéutico, tal como un fármaco anticáncer (por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa).

5 En determinados casos, la presente invención proporciona aparatos y métodos para aislar células tumorales a partir de un homogenado, lisado o extracto celular de un tumor sólido.

En realizaciones particulares, los aparatos y métodos de la presente invención extraen sustancialmente plasma, que contiene proteasas y fosfatasa que pueden degradar o desfosforilar proteínas diana, tales como analitos de interés, y también extraer sustancialmente proteínas interfirientes que pueden afectar los ensayos de la proteína diana.

15 La FIG. 1 representa una realización de un método para aislar y recolectar células tumorales de la presente invención. El experto en la materia reconocerá otros cambios y modificaciones del método comprendidos dentro del alcance de la presente invención.

20 En un método 100, las células tumorales de un paciente, tal como un paciente que sufre de LMC (opcionalmente bajo tratamiento) son aisladas y recolectadas. Tal como se muestra en la FIG. 1, se recoge sangre completa 110 y se filtra para separar los glóbulos rojos. En determinados casos, la sangre completa de los pacientes puede tratarse o no tratarse con un fármaco anticáncer, tal como un inhibidor de BCRABL, previamente al aislamiento. Ventajosamente, los métodos en la presente memoria garantizan que la cantidad y la concentración del inhibidor o agente terapéutico presente en las células *in vivo* se mantengan *in vitro*. En determinados aspectos, la presente invención proporciona un método para preparar un lisado de leucocitos a partir de una muestra de sangre completa sin dilución sustancial, o sustancialmente sin dilución de un agente terapéutico, tal como un fármaco anticáncer. La sangre completa recogida se carga en un aparato tal como se indica en la presente memoria. En determinados aspectos, la sangre se ha extraído recientemente antes del aislamiento de los leucocitos. En el caso de que no se disponga de una muestra de sangre reciente, pueden procesarse muestras de sangre dentro de un periodo, tal como 3 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas (1 día), 36 horas, 48 horas y similares después de la extracción. Las muestras típicamente se mantienen a temperatura ambiente antes del procesamiento. En determinados aspectos, puede añadirse una proteasa y/o inhibidor de fosfatasa a la muestra de sangre 110. A continuación, la sangre se mezcla, por ejemplo, invirtiendo lentamente dentro de un tubo o vial.

35 A continuación, se separan los eritrocitos 121, típicamente mediante centrifugación a través de un filtro o membrana. En determinados aspectos, se utiliza un aparato de filtración especialmente diseñado, tal como se muestra en la presente memoria. Preferentemente, los eritrocitos se encuentran presentes en el tubo de recolección después de la centrifugación. En un aspecto, el método incluye centrifugar el aparato de viales o tubos con el fin de capturar o aislar los leucocitos 142 sobre una membrana de filtración, tal como una colección apilada de membranas de filtración (uno o más filtros), y para separar los glóbulos rojos (y plasma) en un tubo de recolección.

45 Tras la filtración o centrifugación de los glóbulos rojos (y el plasma), se utiliza un tampón de lisis para lisar los leucocitos capturados 167. En un aspecto, puede utilizarse tampón de lisis "Protein later". Tras la captura, posteriormente se lisan los leucocitos, aunque sin una etapa de lavado tras la captura para preparar de esta manera un lisado de leucocitos. La concentración de terapia en las células sanguíneas completas es la misma antes y después del procedimiento 100. En algunos casos, la concentración de terapia es de 10 µM antes del procedimiento 100 y de 10 µM después del procedimiento 100. En otros casos, la concentración de terapia es de 1 µM antes del procedimiento 100 y de 1 µM después del procedimiento 100. En todavía otros casos, la concentración de terapia es de 0,1 µM antes del procedimiento 100 y de 0,1 µM después del procedimiento 100. A continuación, se recolecta el lisado 173 en un segundo tubo de recolección, por ejemplo mediante centrifugación. El lisado de los leucocitos no presenta dilución sustancial, o esencialmente ninguna dilución, del agente terapéutico, tal como un fármaco anticáncer. Es decir, la concentración celular *in vivo* del agente terapéutico (por ejemplo un fármaco anticáncer) es esencialmente o sustancialmente la misma que la concentración *in vitro* del agente terapéutico (por ejemplo el fármaco anticáncer) en el lisado celular.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar un lisado de leucocitos (por ejemplo leucocitos normales, malignos y/o enfermos) de una muestra de sangre completa sin dilución sustancial de un agente terapéutico (por ejemplo un fármaco anticáncer), comprendiendo el método:

- (a) cargar la muestra de sangre completa en un aparato de aislamiento (filtración) celular, tal como un aparato tal como se indica en la presente memoria,
- (b) centrifugar el aparato para capturar los leucocitos sobre la membrana o membranas de filtración apiladas y separar los glóbulos rojos (y plasma) en un tubo de recolección, y
- (c) lisar los leucocitos capturados sobre la membrana o membranas de filtración apiladas con tampón de lisis

aunque sin una etapa de lavado entre las etapas (b) y (c) para preparar de esta manera un lisado de leucocitos.

5 En determinadas realizaciones, el método de la invención comprende además sustituir el tubo de recolección por un segundo tubo de recolección entre las etapas (b) y (c). En otras realizaciones determinadas, el método de la invención comprende además centrifugar el aparato que contiene el segundo tubo de recolección tras lisar los leucocitos en la etapa (c) y recoger el lisado de leucocitos en el segundo tubo de recolección.

10 En algunas realizaciones, la muestra de sangre completa se obtiene de un sujeto que recibe un agente terapéutico (por ejemplo un fármaco anticáncer). En otras realizaciones, la muestra de sangre completa se incuba *in vitro* con un agente terapéutico (por ejemplo un fármaco anticáncer) antes de la carga en el aparato.

15 En realizaciones adicionales, la muestra de sangre completa se obtiene de un sujeto que presenta, o que se sospecha que presenta, aterosclerosis o que recibe tratamiento por aterosclerosis (por ejemplo terapia de estatinas). En otras realizaciones, la muestra de sangre completa se obtiene de un sujeto que presenta, o que se sospecha que presenta, un cáncer, tal como una neoplasia hematológica maligna (por ejemplo una leucemia, tal como leucemia mielógena crónica (LMC)) o que recibe tratamiento para el cáncer (por ejemplo terapia farmacológica para el cáncer).

20 En realizaciones particulares, el nivel de expresión y/o activación de por lo menos una proteína de fusión oncogénica y/o molécula de transducción de señales se mide en el lisado de leucocitos. En realizaciones preferentes, la proteína o proteínas de fusión oncogénicas son BCR-ABL. Se indican en la presente memoria ejemplos adicionales de proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales de interés.

25 De esta manera, en un aspecto, la presente invención proporciona un aparato para aislar y separar leucocitos (por ejemplo leucocitos normales, malignos y/o enfermos) de glóbulos rojos (y plasma) en una muestra de sangre completa, comprendiendo el aparato:

30 un dispositivo de filtración que comprende una cámara superior, una cámara inferior y una o más membranas de filtración apiladas entre las cámaras superior e inferior, en el que la membrana o membranas de filtración apiladas son capaces de retener los leucocitos, y un tubo de recolección para recolectar los glóbulos rojos (y plasma) a partir de la muestra de sangre completa, en el que el dispositivo de filtración se aplica sobre la parte superior del tubo de recolección y en el que los glóbulos rojos (y el plasma) se separan de los leucocitos y se recolectan en el tubo de recolección tras la centrifugación.

35 En algunas realizaciones, la muestra de sangre completa se carga en la cámara superior del dispositivo de filtración. En otras realizaciones, el dispositivo de filtración comprende dos, tres o cuatro membranas de filtración apiladas. En determinadas realizaciones, la cámara superior comprende además una tapa de encaje a presión unida a la misma.

40 En realizaciones adicionales, el aparato comprende además un segundo tubo de recolección, en el que el (primer) tubo de recolección que contiene los glóbulos rojos (y el plasma) se sustituye por el segundo tubo de recolección tras (una primera) centrifugación. En algunos casos, se recolecta un lisado de los leucocitos en el segundo tubo de recolección tras la adición de tampón de lisis a la cámara superior y una (segunda) centrifugación. En casos particulares, se añade el tampón de lisis a la cámara superior sin lavado de la membrana o membranas de filtración apiladas. En algunas realizaciones, el tampón de lisis se incuba en la parte superior del filtro durante como mínimo 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 o 120 minutos, preferentemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 minutos, a 4°C (o sobre hielo) antes de la centrifugación y la recolección en el segundo tubo de recolección.

45 En realizaciones alternativas, el aparato comprende además un segundo tubo de recolección, en el que la membrana o membranas de filtración apiladas se extraen del dispositivo de filtración (por ejemplo con pinzas) tras la centrifugación y se introducen en el segundo tubo de recolección. En algunos casos, el segundo tubo de recolección contiene tampón de lisis y los leucocitos se lisan tras introducir o incubar la membrana o membranas de filtración apiladas en el segundo tubo de recolección.

50 En determinados casos, el lisado preparado utilizando el aparato de la presente invención comprende un extracto celular de leucocitos normales y/o malignos (por ejemplo cancerosos), tales como granulocitos (leucocitos polimorfonucleares), que incluyen, por ejemplo, neutrófilos, basófilos y eosinófilos, agranulocitos (leucocitos mononucleares), incluyendo, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica, tales como linfocitos y monocitos, células de leucemia, que incluyen, por ejemplo células de leucemia mielógena crónica (LMC), macrófagos, que incluyen, por ejemplo, células espumosas y mezclas de las mismas.

55 En determinadas realizaciones, los leucocitos, células de leucemia, células espumosas, células circulantes u otras células presentes en la muestra de sangre completa pueden estimularse *in vitro* con uno o más factores de crecimiento antes, durante y/o después de la incubación con uno o más agentes terapéuticos, tal como uno o más fármacos anticáncer de interés. Entre los factores de crecimiento estimuladores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el factor de crecimiento epidérmico (FCE), la heregulina (HRG), FCT- α , PGF, FNT- α , FCEV, FCDP, IGF, FGF, HGF, citoquinas y similares. Los protocolos para la estimulación y lisis de las células presentes en sangre completa se describen en la publicación de patente PCT n° WO 2008/036802, que se incorpora como referencia en la presente memoria en su

60

65

totalidad para todos los fines.

En determinadas realizaciones, la muestra de sangre completa se obtiene de un sujeto que presenta o que se sospecha que presenta cáncer. En algunos casos, el cáncer puede estar causado por la formación de una proteína de fusión oncogénica debido a una traslocación cromosómica en las células de cáncer. Entre los ejemplos no limitativos de dichos cánceres se incluyen una neoplasia hematológica maligna, un sarcoma osteogénico, un sarcoma de los tejidos blandos y combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, la neoplasia hematológica maligna es una leucemia o linfoma. En una realización preferente, la leucemia es leucemia mielógena crónica (LMC). En otros casos, el sujeto recibe o no recibe terapia farmacológica anticáncer.

En otras realizaciones determinadas, el fármaco anticáncer comprende un agente antiseñalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa, un agente antiproliferativo, un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico), un agente 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 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 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 mesilato de imatinib (Gleevec[®]), niotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW-572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar[®]), leflunómido (SU101), ponatinib (AP24535) 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-quirositol-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 tiosamicarbazona (complejo de Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido 15-mero derivado de los aminoácidos 10 a 24 del protooncogén TCL1 (Hirumura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418, 2004, KP372-1, y los compuestos indicados en Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc. 125:1144-1145, 2003, y Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476, 2003; y las combinaciones de los mismos.

Entre los ejemplos no limitativos de agentes quimioterapéuticos se incluyen los fármacos basados en platino (por ejemplo oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iproplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (por ejemplo ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (por ejemplo 5-fluorouracilo, azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, 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 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 otras realizaciones determinadas, la muestra de sangre completa se obtiene de un sujeto que presenta, o que se sospecha que presenta, aterosclerosis (también conocida como enfermedad vascular aterosclerótica o EVAS). La aterosclerosis es una enfermedad que típicamente afecta a los vasos sanguíneos arteriales, una respuesta inflamatoria crónica en las paredes de las arterias causada en gran medida por la acumulación de macrófagos, tales como células espumosas y estimulada por las lipoproteínas de baja densidad (proteínas del plasma que portan colesterol y triglicéridos) sin eliminación adecuada de grasas y colesterol de los macrófagos por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) funcionales. Entre los ejemplos de fármacos adecuados para el tratamiento de la aterosclerosis se incluyen, aunque sin limitación, estatinas tales como la atorvastatina (Lipitor y Torvast), fluvastatina (Lescol), lovastatina (Mevacor, Altacor, Altoprev), mevastatina (Compactin), pitavastatina (Livalo, Pitava), pravastatina (Pravachol, Selektine, Lipostat), rosuvastatina (Crestor), simvastatina (Zocor, Lipex), combinaciones de los mismos, así como preparaciones de combinación, tales como ezetimibe y simvastatina (Vytorin), lovastatina y niacina (Advicor), atorvastatina y besilato de amlodipina (Caduet) y simvastatina y niacina (Simcor). En algunos casos, el sujeto está recibiendo o está recibiendo terapia con un fármaco para la aterosclerosis, tal como una estatina.
- En otras realizaciones, la muestra de sangre completa se incuba *in vitro* con uno o más agentes terapéuticos, tales como uno o más fármacos anticáncer antes del aislamiento de los leucocitos. En realizaciones particulares, los leucocitos que son retenidos o capturados sobre las membranas de filtración comprenden leucocitos normales, leucocitos malignos o combinaciones de los mismos.
- En realizaciones particulares, los aparatos de la invención permiten preparar el lisado o extracto celular a partir de muestras de sangre completa mediante la recuperación o aislamiento de las células de interés, tales como leucocitos malignos (por ejemplo células de leucemia mielógena crónica (LMC)) sin ninguna etapa de lavado tras la recuperación o aislamiento celular. El extracto celular obtenido de esta manera puede analizarse para el nivel de expresión y/o activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas, tales como BCRABL, sustratos de la misma, rutas de las mismas o combinaciones de las mismas. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, la eliminación de la necesidad de ninguna etapa de lavado tras el aislamiento celular resulta ventajosa porque las células de interés pueden recuperarse a partir de sangre sin modificar la concentración intracelular de un agente terapéutico, tal como un fármaco anticáncer (por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa). Tal como se indica en los Ejemplos, posteriormente, el aislamiento celular utilizando los aparatos indicados en la presente memoria sin ninguna etapa de lavado es contrario a la práctica aceptada en la técnica de lavado de células tras el aislamiento y proporciona extractos celulares a partir de las células recuperadas sin dilución sustancial del agente terapéutico, tal como un fármaco anticáncer (por ejemplo un inhibidor de tirosina quinasa, tal como, por ejemplo, Gleevec[®], Tassigna[®], Sprycel[®], etc.) en el interior de las células.
- En realizaciones particulares, los aparatos de la presente invención son sustancialmente similares o idénticos a los aparatos ilustrados en la presente memoria. El experto en la materia apreciará que pueden modificarse las dimensiones de uno o más componentes del aparato indicados e ilustrados en la presente memoria, considerando parámetros tales como, por ejemplo, el volumen de muestra que debe cargarse en el aparato, el tipo de centrifuga que debe utilizarse para centrifugar el aparato, el volumen de tampón de lisis que debe añadirse a la cámara superior del aparato, etc.
- En referencia a la FIG. 2A-G, tal como se muestra en ella, existe un dispositivo o aparato de filtración para la recolección de muestras. La FIG. 2A es la parte o cámara superior del aparato 201 que es un tubo cilíndrico con estrías helicoidales macho o roscas 210. La parte superior con tapa 215 se muestra en la FIG. 2B-C. Dicha parte superior 201 opcionalmente puede presentar una tapa 215 que se cierra a presión para evitar el derrame de la muestra. En determinadas realizaciones, la tapa de cierre a presión 215 se sujeta mediante una correa 217 a la parte superior y puede utilizarse para cerrar de manera segura la apertura de la cámara superior tras añadir una muestra y/o reactivo al dispositivo de filtración. La cámara superior 201 del aparato de la presente invención preferentemente se une a una parte de cámara inferior o cámara 222 tal como se muestra en la FIG. 2D-E. Las roscas 210 de la parte superior se ajustan de manera segura en estrías hembra 221 de la parte o cámara inferior 222. Preferentemente, los diámetros internos de las cámaras superior e inferior son similares de manera que crean un tubo cilíndrico que permite el paso de líquidos por el mismo.
- En determinados aspectos, la cámara inferior 222 del dispositivo o aparato de filtración es un tubo cilíndrico con una rosca interna en un extremo 221 (FIG. 2E). En determinados aspectos, una o más (por ejemplo una pluralidad, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) membranas de filtración apiladas se sitúan entre las roscas de la cámara superior y la cámara inferior antes de unir firmemente las cámaras una a otra. El filtro o filtros descansan sobre la rueda 225 de la cámara inferior tal como se muestra en la FIG. 2E.
- En aspectos particulares, las membranas de filtración pueden presentar 2 a 4 (por ejemplo 2, 3 o 4) capas de filtros, tales como filtros Pall (por ejemplo medio Leukosorb). En otros aspectos, el dispositivo de filtración es un ensamblaje de cámaras y filtros separados que se unen entre sí previamente a la utilización, tal como en un kit. El dispositivo de filtración puede aplicarse en la parte superior de un tubo de recolección 250, tal como se muestra en la FIG. 2F-G para la separación de los glóbulos rojos (y el plasma) de una muestra de sangre del paciente. Las partes de las FIGS. 2A, 2D y 2F se unen o encajan entre sí para formar una realización del aparato dispositivo de filtración de la presente

invención. El dispositivo de filtración (cámaras superior e inferior) puede aplicarse en la parte superior de un tubo de recolección 250 para la separación de los glóbulos rojos de una muestra de sangre del paciente. La cámara inferior del dispositivo de filtración ensamblado se sitúa en el recipiente de recolección mediante la apertura 255 y la cámara superior, en la parte superior de la apertura del recipiente de recolección. Entre los ejemplos de recipientes de recolección 250 se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, tubos tales como tubos de cultivo de plástico que presentan una capacidad de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 14 ml, 16 ml y similares.

En determinados aspectos, la parte inferior del dispositivo de filtración de la presente invención presenta un embudo incorporado u opcional en la parte inferior. Tal como se muestra en la FIG. 3A-E, el embudo puede presentar una determinada dimensión angular para garantizar que la muestra pasa al interior y por la cámara inferior hasta el interior del tubo de recolección sin bajar por la pared interna de la parte inferior. Por ejemplo, la FIG. 3A muestra un embudo interno 301 de aproximadamente 2° sobre la horizontal. La FIG. 3B muestra un embudo interno 310 de aproximadamente 7° sobre la horizontal. En otros aspectos determinados, la FIG. 3C muestra un embudo de aproximadamente 12° sobre la horizontal. Las FIGS. 3D y 3E son todavía otras realizaciones del diseño de embudo de la presente invención. Tal como entenderá y apreciará el experto en la materia, el diseño del embudo puede ser de cualquier ángulo que permita que el filtrado no permanezca sobre las paredes de la parte inferior. Entre los ángulos adecuados se incluyen 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10°, 11°, 12°, 13°, 14°, 15°, 16°, 17°, 18°, 19°, 20° o más para la parte de embudo. En una realización alternativa, la FIG. 3E muestra una inserción 325 de embudo en la parte inferior de un dispositivo de filtración de la presente invención.

En determinados aspectos, el dispositivo de filtración de la presente invención se muestra en la FIG. 4A-D. La FIG. 4A muestra la vista de despiece de la parte o cámara superior 410, una parte o cámara inferior 420 y una pila de filtros 412 entre ellas. En la FIG. 4A, la vista 405 es una vista en planta superior del dispositivo y la vista 422 es una vista en planta inferior del dispositivo. La FIG. 4B muestra la parte superior 430 y la cámara o parte inferior 420 enroscados una con otra. En la FIG. 4B, la vista 405 es una vista en planta superior del dispositivo y la vista 425 es una vista en planta inferior del dispositivo. La FIG. 4C muestra el tubo de recolección 435. Durante el funcionamiento, en determinados aspectos, el tubo de recolección 435 preferentemente contiene glóbulos rojos. En la FIG. 4C, la vista 434 es una vista en planta superior del dispositivo y la vista 440 es una vista en planta inferior del dispositivo. La FIG. 4D ilustra el tubo de recolección 435 unido a la cámara superior 410 y la cámara o parte inferior 420. En la FIG. 4D, la vista 405 es una vista en planta superior del dispositivo y la vista 461 es una vista en planta inferior del dispositivo.

En algunas realizaciones, durante el funcionamiento, se carga un volumen (por ejemplo 1 ml) de sangre del paciente tratada con una mezcla solución que comprende una proteasa y/o inhibidores de fosfatasa en la cámara superior de un aparato de aislamiento celular ensamblado. El aparato puede centrifugarse en una centrífuga de laboratorio o clínica, tal como una centrífuga Allerga 6R (Beckman), centrífuga Sorvall Legend (Thermo Scientific) o centrífuga Heraeus Megafuge (Kendro). En algunos aspectos, el aparato se centrifuga durante 5 a 30 minutos a 600-2.000 rpm a 4°C. Tras la centrifugación, el recipiente de recolección que contiene los glóbulos rojos (y el plasma) se extrae del aparato de aislamiento celular, se tapa y se reserva.

En realizaciones adicionales, se une un segundo recipiente de recolección al dispositivo de filtración. Entre los ejemplos no limitativos de un segundo tubo de recolección para el lisado celular se incluyen tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y de 2 ml. Sin una etapa de lavado se añade el tampón de lisis a la cámara superior del dispositivo de filtración. Se aplica la tapa a la cámara superior y el dispositivo de filtración y el segundo tubo de recolección se agitan vigorosamente. En determinados casos, el aparato de aislamiento celular se incuba a 4°C durante como mínimo 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 o 120 minutos, preferentemente durante aproximadamente 15 a aproximadamente 30 minutos. A continuación puede centrifugarse el aparato (por ejemplo a 3.000 rpm durante 5 min.). El lisado celular puede transferirse a otro recipiente de centrifuga, tal como un tubo de microcentrífuga para el almacenamiento a -70°C.

La FIG. 5A-D muestra una realización alternativa del dispositivo o aparato de filtración 500 para la recolección de muestras de la presente invención. En la presente realización, existe una parte superior 501 y una parte o cámara inferior 530 con una vaina o conector intermedio 522. El conector o vaina intermedio 522 puede fijarse opcionalmente a la parte superior 501 o inferior 530. Tal como se muestra en la FIG. 5B, en determinados aspectos, la parte superior presenta estrías o estrías macho y puede fijarse a la vaina o parte inferior. En la FIG. 5B, el aparato se muestra con tapa 510. La FIG. 5C muestra que la parte inferior 530 puede presentar opcionalmente una tapa 534 para mantener esta parte sellada. La FIG. 5D ilustra una cámara o parte inferior 522 que muestra claramente estrías hembra. Esta parte puede fijarse opcionalmente a la parte inferior de manera que la vaina sea una parte integral de la parte inferior del dispositivo.

La FIG. 6A-C muestra todavía otro aspecto de la presente invención. La FIG. 6A es una vista de sección transversal de un dispositivo de la presente invención, en la que la parte inferior 610 se une con la parte superior 625 con la vaina 633 permitiendo la unión. El recuadro FIG. 6B es una vista ampliada de las partes unidas entre sí con roscas 625 y la sección intermedia 633 con una sección de embudo, también se muestra la cámara de recolección 610. La FIG. 6C muestra la sección intermedia con geometría de rueda. La pila de filtros opcionalmente descansa sobre dicha rueda.

En otras realizaciones adicionales, tras centrifugar el aparato de aislamiento celular y recolectar los glóbulos rojos y

apartarlos en el tubo de recolección, se separan (por ejemplo se desenroscan) la cámara superior y la cámara inferior del dispositivo de filtración. Utilizando pinzas, las membranas de filtración 422 (FIG. 4A) que contienen los leucocitos separados y/o células tumorales circulantes se introducen en un segundo recipiente de recolección que contiene tampón de lisis celular. Entre los ejemplos no limitativos de un segundo tubo de recolección se incluyen tubos de microcentrífuga de 1,5 ml y de 2 ml. En algunos casos, el segundo aparato de recolección se incubaba adicionalmente a 4°C durante como mínimo 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 o 120 minutos, preferentemente durante aproximadamente 15 a aproximadamente 30 minutos. En otros aspectos, el segundo recipiente de recolección se deja sobre hielo y se agita con vórtex brevemente durante 10 segundos cada 10 minutos durante un total de 30 minutos. En algunas realizaciones, el lisado celular se almacena a -70°C. En otras realizaciones, el recipiente que contiene el lisado se centrifuga para separar las membranas de filtración y los fragmentos celulares. El sobrenadante del lisado celular puede transferirse a otro tubo para el almacenamiento a -70°C.

En algunas realizaciones, los aparatos de la invención se proporcionan en forma de un kit estéril. En algunos casos, el kit estéril comprende un dispositivo de filtración que comprende una cámara superior (opcionalmente con una tapa de ajuste a presión unida), una cámara inferior y una pila de una o más membranas de filtración (por ejemplo 1, 2, 3 o 4 capas de membrana de filtración) y uno o una pluralidad de tubos de recolección (opcionalmente con tapas de ajuste a presión). Cada uno de los componentes puede empaquetarse separadamente y el kit ensamblarse o cada uno de los componentes puede introducirse en un paquete estéril. En otros casos, el kit estéril comprende una unidad de tubo de filtración y uno o una pluralidad de tubos de recolección (opcionalmente con tapas de ajuste a presión). La unidad de tubo de filtración comprende un tubo cilíndrico fijado en un extremo con una o más (por ejemplo una pluralidad de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) membranas de filtración, en el que las membranas son capaces de retener leucocitos sanos y malignos y/o células tumorales circulantes a partir de muestras de sangre completa. En aspectos particulares, las membranas de filtración son (por ejemplo 2, 3 o 4) capas de filtros, tales como filtros Pall (por ejemplo medio Leukosorb). En todavía otros casos, el kit estéril comprende una unidad de tubo de filtración, un adaptador de plástico y uno o una pluralidad de tubos de recolección (opcionalmente con tapas de ajuste a presión). El adaptador se aplica en la apertura de un tubo de recolección y se fija firmemente a la membrana de filtración de la unidad de tubo de filtración.

En realizaciones adicionales, el aparato de la presente invención comprende una pluralidad de dispositivos de filtración o unidades de tubo de filtración y un recipiente de recolección multipocillo o multitubo, tal como una placa de 2 pocillos, 12 pocillos, 24 pocillos, 48 pocillos o 96 pocillos. En determinados casos, la pluralidad de dispositivos de filtración puede ser sustancialmente similar a por lo menos dos o más de los dispositivos ilustrados en la FIG. 4D. En otras realizaciones determinadas, la serie de dispositivos de filtración puede ser una placa multipocillo, tal como una placa de aislamiento celular de 96 pocillos. Por ejemplo, a una primera placa de filtración de 96 pocillos pueden incorporarse membranas de filtración (por ejemplo LeukoLOCK (Life Technologies) o Acroprep (PALL) o Leukosorb (PALL)) o membranas sustancialmente similares a las mismas. En otras realizaciones, la primera placa de filtración de 96 pocillos es sustancialmente similar o es una placa multipocillo disponible comercialmente con membranas de filtración incorporadas, tales como, aunque sin limitación, Millipore n° de cat. MAMIC8510 y n° MSBCS1210. En algunos casos, las placas multipocillo disponibles comercialmente son estériles y comprenden una primera placa multipocillo con membranas de filtración incorporadas y una segunda placa multipocillo que encaja bajo la primera placa multipocillo y puede utilizarse como recipiente de recolección. En dichas realizaciones, puede cargarse sangre recién recolectada en los pocillos de una primera placa de aislamiento celular de 96 pocillos. La primera placa multipocillo es análoga a tanto la cámara superior como la cámara inferior del dispositivo de filtración comentado anteriormente. Una segunda microplaca de 96 pocillos puede servir como placa de recolección de sangre (que es análoga al tubo de recolección) y puede situarse bajo la primera placa multipocillo, es decir, la placa de aislamiento celular con membranas de filtración. Este ensamblaje de placas puede centrifugarse a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min. a una velocidad comprendida entre aproximadamente 600 rpm y 3.000 rpm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 600 rpm, 1.000 rpm, 2.000 rpm y 3.000 rpm. Tras la centrifugación, la membrana de filtración puede transferirse a un tubo de centrifugación y las células de la membrana de filtración pueden tratarse con un volumen de tampón de lisis (por ejemplo 300 µl de tampón de lisis) y agitarse con vórtex brevemente, con el fin de lisar las células. El tubo de centrifugación que contiene el lisado celular puede dejarse sobre hielo durante aproximadamente 30 minutos y someterse a una breve agitación con vórtex aproximadamente cada 10 minutos. A continuación, el tubo puede centrifugarse durante aproximadamente 15 minutos para separar los residuos celulares del sobrenadante. El sobrenadante que contiene el lisado puede recolectarse y analizarse. En determinados aspectos, la pluralidad de dispositivos de filtración se manipula con una estructura robotizada bajo control de ordenador. Se lleva a cabo el análisis de alto rendimiento de las muestras y se analiza la pluralidad de muestras. Las etapas del procedimiento 100, tal como la adición de tampón de lisis para lisar los leucocitos capturados 167, se llevan a cabo opcionalmente con un sistema robótico computerizado. En algunos aspectos, el tratamiento *in vitro* de la muestra de sangre del paciente con fármaco anticáncer y el análisis de las muestras tal como se indica en la presente memoria se llevan a cabo en modo de alto rendimiento.

IV. Selección de fármaco y optimización para la terapia del cáncer

En determinados aspectos, la presente invención proporciona métodos para el seguimiento de la eficacia de la terapia del cáncer en sujetos con una neoplasia hematológica maligna. En determinados aspectos, la presente invención

proporciona métodos para la selección de terapias apropiadas para regular negativamente o cerrar una o más de las rutas de señalización desreguladas. En otros aspectos determinados, la presente invención proporciona métodos para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto que presenta cáncer y que recibe un curso de terapia para el tratamiento del cáncer. De esta manera, la presente invención puede utilizarse para facilitar el diseño de terapias personalizadas basadas en la firma molecular particular proporcionada por la colección de proteínas de fusión oncogénicas activadas y/o proteínas de transducción de señales en un tumor o cáncer de un paciente dado.

De acuerdo con lo anterior, en un aspecto particular, la presente invención proporciona un método para el seguimiento de la eficacia de un fármaco anticáncer en un sujeto, en el que el sujeto presenta una neoplasia hematológica maligna, que comprende:

- (a) administrar el fármaco anticáncer en el sujeto, en el que la primera administración del fármaco anticáncer se realiza en el tiempo T_1 ,
- (b) aislar células de un cáncer en un tiempo T_2 en una muestra del sujeto,
- (c) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (d) medir el estado de activación y/o el nivel de expresión de una proteína de fusión oncogénica en un tiempo T_2 en una muestra del sujeto y determinar un curso de tratamiento basándose en el estado de activación y/o nivel de expresión de la proteína de fusión oncogénica.

En determinadas realizaciones, el método comprende además medir el estado de activación de la proteína de fusión oncogénica en T_0 , es decir, antes de la primera administración del fármaco anticáncer. En algunos casos, la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL. En determinados casos, la neoplasia hematológica maligna es un linfoma o una leucemia, tal como leucemia mielógena crónica (LMC). La diferencia temporal entre T_1 y T_2 es de entre aproximadamente 1 semana y aproximadamente 6 meses, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 semanas. La diferencia temporal entre T_0 y T_1 es de entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 3 semanas. En otros aspectos determinados, los métodos incluyen además medir los niveles de expresión y/o activación de por lo menos otra molécula de transducción de señales, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC.

En determinados aspectos, el curso del tratamiento se selecciona de entre modificar la dosis de fármaco anticáncer, modificar el fármaco anticáncer, incluyendo un fármaco anticáncer adicional, modificar la duración del tratamiento y permanecer en el curso de tratamiento preexistente.

En determinados aspectos, la muestra comprende un extracto de células aisladas. En determinados aspectos, las células aisladas se incuban *in vitro* con por lo menos un fármaco anticáncer (por ejemplo 2 fármacos anticáncer) en T_0 (antes del inicio del tratamiento). En otros casos, las células aisladas se incuban *in vitro* con por lo menos dos fármacos anticáncer en T_2 , antes de determinar el curso del tratamiento.

En todavía otras realizaciones, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer en un sujeto que presenta una neoplasia hematológica maligna:

- (a) aislar células de un cáncer de un sujeto,
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) medir el nivel del estado de activación de una proteína de fusión oncogénica en una célula aislada de una muestra del sujeto,
- (d) incubar la célula aislada con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento,
- (e) lisar las células aisladas con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento para producir un extracto celular,
- (f) medir el nivel del estado de activación de la proteína de fusión oncogénica en las células incubadas, y
- (g) seleccionar un curso de tratamiento basándose en el nivel del estado de activación de la proteína de fusión oncogénica.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer en un sujeto que presenta una neoplasia hematológica maligna:

- (a) aislar células de un cáncer de un sujeto,
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) medir el nivel del estado de activación de BCR-ABL en una célula aislada de una muestra del sujeto,
- (d) incubar la célula aislada con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento,
- (e) lisar las células aisladas incubadas con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento para producir un extracto celular,
- (f) medir el nivel del estado de activación de BCR-ABL en las células incubadas, y
- (g) seleccionar un curso de tratamiento basándose en el nivel del estado de activación de BCR-ABL.

En determinados aspectos, el curso de tratamiento se selecciona de entre el grupo que consiste de selección de fármaco anticáncer, selección de la dosis anticáncer y determinación de la duración del tratamiento. En otros aspectos determinados, los métodos incluyen además medir los niveles de expresión y/o activación de por lo menos otra molécula de transducción de señales, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto que presenta cáncer y que recibe un curso de terapia para el tratamiento del cáncer, comprendiendo el método:

- (a) aislar las células de cáncer tras la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo uno o más inhibidores de tirosina quinasa, tal como Gleevec[®], Tasigna[®], Spryzel[®], etc.),
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular,
- (c) medir un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo indicado en la presente memoria, y
- (d) comparar el nivel de expresión y/o activación medido de la proteína de fusión oncogénica con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica medido en un tiempo anterior durante el curso de la terapia, y
- (e) determinar una dosis posterior del curso de terapia para el sujeto o si debería administrarse un curso de terapia diferente en el sujeto basándose en la comparación de la etapa (d).

En realizaciones particulares, se miden los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo BCRABL) tanto total como activada (por ejemplo fosforilada) en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpos de la presente invención y una proporción de niveles de proteína de fusión oncogénica activada a total (por ejemplo proporción de niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) puede calcularse y utilizarse para evaluar el curso de la terapia para un sujeto, por ejemplo mediante comparación de la proporción fosfo/total de niveles de proteína de fusión oncogénica con una proporción de lo anterior calculada para el sujeto en un tiempo anterior (por ejemplo en un tiempo anterior mientras se encontraba bajo terapia farmacológica anticáncer o en un punto temporal anterior a la terapia farmacológica anticáncer).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer, comprendiendo el método:

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo indicado en la presente memoria, y
- (d) determinar si el fármaco anticáncer resulta adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer mediante comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específicos para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido,
- (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer, y
- (e) indicar que el fármaco anticáncer resulta adecuado para el tratamiento del cáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica ha cambiado (por ejemplo se ha reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

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 cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna. En determinadas realizaciones, el método comprende adicional o alternativamente la etapa de indicar que el fármaco anticáncer resulta inadecuado para el tratamiento del cáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no haya cambiado (por ejemplo no se haya reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En realizaciones adicionales, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se determina que el fármaco anticáncer resulta adecuado o inadecuado basándose en este "perfil molecular".

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

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo indicado en la presente memoria, y
 (d) identificar el cáncer como respondedor o no respondedor al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante comparación del estado de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

En una realización preferente, el método para identificar la respuesta de un cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer comprende:

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específicos para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido,
 (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer, y
 (e) indicando que el cáncer responde al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica haya cambiado (por ejemplo se ha reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para ayudar o asistir en la identificación de la respuesta de un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna, al tratamiento con un fármaco anticáncer. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la identificación de la respuesta de un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna, al tratamiento con un fármaco anticáncer. En determinadas realizaciones, el método comprende adicional o alternativamente la etapa de indicar que el cáncer no es respondedor al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no haya cambiado (por ejemplo no se haya reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En realizaciones adicionales, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se identifica el cáncer como respondedor o no respondedor al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

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

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo indicado en la presente memoria, y
 (d) identificar la probabilidad de que el sujeto responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específicos para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido,
 (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer, y
 (e) indicando que el cáncer responde al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica haya cambiado (por ejemplo se ha reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

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 para un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna. 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 para un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna. En determinadas realizaciones, el método comprende adicional o alternativamente la etapa de indicar que es probable que el sujeto no

es probable que responda al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no haya cambiado (por ejemplo no se haya reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En realizaciones adicionales, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se predice la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para determinar si un sujeto que presenta cáncer es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo indicado en la presente memoria, y
- (d) determinar si el sujeto es resistente o sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un tiempo anterior.

En una realización preferente, el método para determinar si un sujeto que presenta cáncer es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer comprende:

- (a) aislar células de un cáncer 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) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular utilizando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específica para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura se inmovilizan sobre un soporte sólido,
- (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un tiempo anterior, e
- (e) indicar que el sujeto es resistente al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica haya cambiado (por ejemplo no se haya reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para ayudar o asistir en la identificación de un sujeto que presenta cáncer que es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer o en la determinación de si un sujeto que presenta cáncer es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer, en el que el sujeto presenta un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden resultar útiles para mejorar la identificación de un sujeto que presenta cáncer que es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer o en la determinación de si un sujeto que presenta cáncer es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer, en el que el sujeto presenta un cáncer, tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica maligna.

En determinadas realizaciones, el método comprende adicional o alternativamente la etapa de indicar que el cáncer es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer en el caso de que el nivel de expresión y/o activación (por ejemplo de fosforilación) detectado para la proteína de fusión oncogénica haya cambiado (por ejemplo se haya reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión o activación de referencia. Entre los ejemplos no limitativos de motivos por los que un sujeto que presenta cáncer sería resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer se incluyen la presencia de una o más mutaciones en la proteína de fusión oncogénica de interés (por ejemplo BCRABL), el no cumplimiento con el régimen terapéutico y/o la administración de una dosis de fármaco subóptima. Con respecto a una dosis de fármaco subóptima del fármaco anticáncer, el método puede comprender además la etapa de incrementar la dosis siguiente o posterior del fármaco anticáncer administrado en el sujeto. En realizaciones adicionales, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se identifica el sujeto como resistente o sensible al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

V. Proteínas de fusión oncogénicas

En realizaciones particulares, el perfilado de expresión/activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas, solas o en combinación con el perfil de expresión/activación de sustratos de las mismas y/o otras proteínas de ruta de transducción de señales puede llevarse a cabo con lisados celulares preparados utilizando los aparatos y métodos de la presente invención, por ejemplo para determinar la eficacia de la terapia de inhibidor de tirosina quinasa para los pacientes que la requieren (por ejemplo pacientes con una enfermedad mediada por BCR-ABL, tal como la leucemia mielógena crónica). Las proteínas de fusión oncogénicas y otros analitos se interrogan ventajosamente en lisados

celulares preparados mediante los aparatos y métodos de la invención sin modificar la concentración intracelular del inhibidor de tirosina quinasa.

- 5 En determinadas realizaciones, entre las traslocaciones en tumores humanos que provocan la formación de proteínas de fusión oncogénicas y sus neoplasmas asociados se incluyen, aunque sin limitación, las siguientes:

Leucemia mielógena crónica (LMC): el cromosoma Philadelphia es una traslocación que resulta en BCR/ABL (quinasa).

- 10 Leucemia linfoblástica aguda (LLA): entre las proteínas oncogénicas quiméricas se incluyen:

Traslocación citogenética	Anormalidad genética molecular	%
cryptic t(12;21)	TEL/AML1 (quinasa)	25,4%
t(1;19)(q23;p13)	E2A/PBX(PBX1)	4,8%
t(9;22)(q34;q11)	Fusión BCR/ABL (P185)	1,6%
t(4;11)(q21;q23)	Fusión MLL/AF4	1,6%
t(8;14)(q24;q32)	Fusión IGH/MYC	
t(11;14)(p13;q11)	Fusión TCR/RBTN2	

Linfoma de Burkitt: traslocación del gen *c-myc* t(8;14)(q24;q32). La oncoproteína quimérica más común es *cmyc*/IGH.

- 15 LMA: traslocación de una parte del cromosoma 8 al cromosoma 21. La oncoproteína quimérica resultante es RUNX1/ETO. Otra traslocación, t(12;15)(p13;q25) resulta en la oncoproteína quimérica TEL/TrkC (quinasa).

Sarcoma de Ewing: traslocación entre los cromosomas 11 y 22. La oncoproteína quimérica resultante es EWS/FLI (factor de transcripción).

- 20 DFSP: más de 95% de los tumores DFSP presentan la traslocación cromosómica t(17:22), que resulta en la oncoproteína quimérica COL1A1/FCDP (se une y activa FCDP).

- 25 Leucemia promielocítica aguda: una traslocación indicada como t(15:17)(q22;q12). La oncoproteína quimérica resultante es RAR α /PML (proteína de complejo de transcripción).

Leucemia linfoblástica aguda de células proB: traslocación t(17:19), que resulta en la oncoproteína quimérica E2A/HLF (inhibidor de apoptosis).

- 30 Leucemia de células preB aguda: traslocación t(1;19). La oncoproteína quimérica es E2A/Pbx1 (sustrato de quinasa).

Rabdomiosarcoma: traslocación de t(2:13)(q35;q14), que resulta en la oncoproteína quimérica PAX3/FKHR (factor de transcripción).

- 35 Una neoplasia maligna de los tejidos blandos de niños muy pequeños: la reorganización t(12;15)(p13;q25) resulta en la oncoproteína quimérica siguiente: proteína tirosina quinasa ETV6/NTRK3 (quinasa).

Carcinoma papilar tiroideo: la oncoproteína quimérica es RET/PTC (quinasa).

- 40 Cáncer de próstata: la oncoproteína quimérica es TMRSS/ERG (quinasa).

Ejemplos adicionales de traslocaciones en tumores humanos que provocan la formación de proteínas de fusión oncogénicas y sus neoplasmas asociados:

Oncogén	Neoplasma
<i>bcr/abl</i>	leucemia mielógena crónica; leucemia linfocítica aguda
<i>dek/can</i>	leucemia mieloide aguda
<i>E2A/pbx1</i>	leucemia aguda de células pre-B
<i>PML/RAR</i>	leucemia promielocítica aguda
<i>?/erg</i>	leucemia mieloide
<i>irel/urg</i>	linfoma de células B
<i>CBFB/MYH11</i>	leucemia mieloide aguda
<i>aml1/mtg8</i>	leucemia mieloide aguda
<i>ews/fli</i>	sarcoma de Ewing
<i>lyt-10/Cα1</i>	linfoma de células B
<i>hrx/enl</i>	leucemias agudas
<i>hrx/af4</i>	leucemias agudas
<i>NPM/ALK</i>	linfomas de células grandes

Adaptado de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2a ed. Boston y London: Jones and Bartlett, 1995.

VI. Ejemplos

- 5 Los ejemplos siguientes se ofrecen a título ilustrativo, aunque no limitativo, de la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Aparatos ejemplares de aislamiento celular.

10 El presente ejemplo describe aparatos ejemplares de aislamiento celular para la separación de leucocitos procedentes de sangre completa del paciente utilizando un método de filtración. Se ilustran en las FIG. 2-6 realizaciones y aspectos de un aparato de aislamiento celular de la presente invención.

15 El aparato de aislamiento celular de la presente invención se utiliza para separar los glóbulos rojos de otras células presentes en la sangre completa. En particular, se separan leucocitos y/o células tumorales circulantes de un número significativo de glóbulos rojos y plasma presente en la sangre completa. El aparato de aislamiento celular de la presente invención comprende un dispositivo de filtración y un recipiente de recolección. El dispositivo de filtración es un ensamblaje que comprende una cámara superior, una cámara inferior y una o más (por ejemplo una pluralidad de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) membranas de filtración apiladas entre las cámaras superior e inferior. Las cámaras superior e inferior pueden realizarse en materiales tales como, aunque sin limitación, polipropileno y poliestireno. En determinadas realizaciones, la membrana de filtración presenta un tamaño de poro de 8 µm y un grosor de entre 355,6 y 558,8 µm y presenta un rendimiento de retención de leucocitos de entre 70% y 80%. Un ejemplo no limitativo de una membrana de filtración incluye medio de aislamiento de glóbulos blancos (Leukosorb) (PALL nº de cat. BSP0669).

25 Típicamente, se carga 1 ml de sangre del paciente tratada con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa en la cámara superior del aparato de aislamiento celular. La unidad se centrifuga durante 5 a 30 minutos a 600-2.000 rpm (por ejemplo a 800 rpm) a 4°C en una centrífuga de laboratorio, tal como una centrífuga Allegra 6R (Beckman), una centrífuga Sorvall Legend (Thermo Scientific) o una centrífuga Heraeus Megafuge (Kendro). En determinados casos, se extrae el primer recipiente de recolección que contiene los glóbulos rojos del aparato de aislamiento celular y se une un segundo recipiente de recolección. Sin etapas de lavado, se añaden 200 µl-1 ml de tampón de lisis a la cámara superior del dispositivo de filtración. Se tapa la cámara superior y el dispositivo de filtración y el segundo recipiente de recolección se agitan vigorosamente durante 15 a 30 minutos a 4°C. El dispositivo de filtración y el segundo recipiente de recolección se introducen en una centrífuga y se centrifugan a aproximadamente 3.000 rpm durante aproximadamente 5 minutos. El lisado celular puede transferirse a otro recipiente para el almacenamiento a -70°C.

35 En otros casos, se extrae el primer recipiente de recolección que contiene los glóbulos rojos del aparato de aislamiento celular y se desmonta el dispositivo de filtración que contiene las membranas de filtración. Las cámaras superior e inferior se desenroscan para separarlas una de otra. Utilizando pinzas se introducen las membranas de filtración que contienen los leucocitos separados, en un segundo recipiente de recolección que contiene tampón de lisis. Entre los ejemplos no limitativos de un segundo tubo de recolección se incluyen tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y de 2 ml. En algunos casos, el segundo aparato de recolección se incuba adicionalmente a 4°C durante como mínimo 1, 5, 10, 15, 20, 30, 60 o 120 minutos, preferentemente durante aproximadamente 15 a aproximadamente 30 minutos. En otros casos, el segundo recipiente de recolección se deja sobre hielo y se agita con vórtex brevemente durante 10 segundos cada 10 minutos durante un total de 30 minutos. En algunas realizaciones, el lisado celular se almacena a -70°C. En otras realizaciones, el recipiente que contiene el lisado se centrifuga para separar las membranas de filtración y los fragmentos celulares. El sobrenadante del lisado celular puede transferirse a otro tubo para el almacenamiento a -70°C.

En todavía otra realización, el aparato de aislamiento celular comprende una unidad de tubo de filtración y un recipiente de recolección (FIG. 26). La unidad de tubo de filtración comprende un tubo cilíndrico fijado en un extremo con una o más (por ejemplo una pluralidad de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) membranas de filtración, en el que las membranas son capaces de retener leucocitos sanos y malignos y/o células tumorales circulantes a partir de muestras de sangre completa. En aspectos particulares, las membranas de filtración son (por ejemplo 2, 3 o 4) capas de filtros, tales como filtros Pall (por ejemplo medio Leukosorb). En determinados casos, cada filtro presenta un tamaño de poro de 8 μm y un grosor de entre 355,6 y 558,8 μm y presenta un rendimiento de retención de leucocitos de entre 70% y 80%. En determinados casos, la unidad de tubo de filtración se une a un recipiente de recolección mediante un adaptador de plástico. La membrana de filtración de la unidad de tubo de filtración se fija firmemente al adaptador, que se sitúa en la apertura de un tubo de recolección. Entre los ejemplos de recipientes de recolección se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, tubos de cultivo de plástico de 3 ml, 5 ml, 8 ml, 14 ml y 16 ml. En determinadas realizaciones, se carga 1 ml de sangre del paciente tratada con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa en la parte superior de la unidad de tubo de filtración del aparato de aislamiento celular. La unidad se centrifuga durante 5 a 30 minutos a 600-2.000 rpm (por ejemplo a 800 rpm) a 4°C en una centrifuga de laboratorio, tal como una centrifuga Allegra 6R (Beckman), una centrifuga Sorvall Legend (Thermo Scientific) o una centrifuga Heraeus Megafuge (Kendro). En determinados casos, se extrae el tubo de recolección que contiene los glóbulos rojos del aparato de aislamiento celular y se une un nuevo tubo de recolección. Sin etapas de lavado, se añadieron 200 μl -1 ml de tampón de lisis a la apertura de la unidad de tubo de filtración del aparato de aislamiento celular. El aparato se sella o se cierra con un tapón, y después se agita vigorosamente durante 15 a 30 minutos a 4°C. Se centrifuga el aparato de aislamiento celular y se centrifuga a aproximadamente 3.000 rpm durante aproximadamente 5 minutos en una centrifuga de laboratorio. A continuación, el lisado celular puede transferirse del recipiente de recolección a otro recipiente para el almacenamiento a -70°C.

En todavía otra realización, el aparato de aislamiento celular de la presente invención comprende una pluralidad de dispositivos de filtración o unidades de tubo de filtración y un recipiente de recolección multipocillo o multitubo. Los dispositivos de filtración y unidades de tubo de filtración indicadas anteriormente pueden unirse a pocillos de una placa multiformato, tal como una placa de 12 pocillos, 24 pocillos, 48 pocillos o 96 pocillos.

Ejemplo 2. Protocolo para el aislamiento de células tumorales a partir de sangre de paciente con LMC mediante el método de filtración utilizando un aparato de aislamiento celular.

El presente ejemplo detalla el protocolo utilizado para aislar y recolectar células tumorales de LMC en sangre completa de un paciente individual utilizando un método de la presente invención. La sangre completa del paciente puede tratarse *in vitro* o no tratarse con inhibidores de BCRABL previamente al aislamiento.

Las muestras de sangre recién extraída son las mejores para el aislamiento de células tumorales. En el caso de que no puedan obtenerse muestras frescas, las muestras de sangre pueden procesarse en 1-3 días después de la extracción. Las muestras recogidas en EDTA (Becton Dickinson, nº de cat. 366643, tubos estériles con EDTA (K2)) se envían para el procesamiento el día de la extracción. Las muestras deben mantenerse a temperatura ambiente antes del procesamiento. Es importante evitar la refrigeración o congelación de las muestras en este punto.

La muestra de sangre recibida en tubos EDTA (BD nº 366643) se trata con inhibidores de proteasa y de fosfatasa. El tubo de sangre se mezcla suavemente invirtiendo lentamente 4 a 6 veces, y después se añaden 0,05 ml de un cóctel de inhibidores de proteasa y de fosfatasa por cada 1 ml de sangre. En este punto del protocolo, pueden aislarse células tumorales y glóbulos blancos a partir de la muestra de sangre pasando a la sección del presente ejemplo titulada "Aislamiento y lisis de células tumorales y glóbulos blancos". Opcionalmente, la muestra de sangre puede tratarse con un fármaco antes de continuar con dicha sección.

Tratamiento farmacológico de muestras de sangre de paciente

El fármaco, tal como un inhibidor de BCR-ABL, se diluye en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) antes de añadirse a la muestra de sangre. Se introduce 1,0 ml de muestra de sangre del paciente en un tubo de cultivo. Se añade la concentración deseada de fármaco a cada alícuota de sangre del paciente. Por ejemplo, se añaden al tubo 10 μl , 1 μl o 0,1 μl que corresponden a una concentración de fármaco de 10 μM , 1 μM o 0,1 μM . Puede utilizarse a modo de control un mililitro (1 ml) de sangre no tratada en un tubo separado. A continuación, los tubos se incuban durante 4 horas a 37°C en un incubador de CO₂. Después, la muestra tratada con fármaco puede procesarse adicionalmente siguiendo el procedimiento de la sección siguiente con el fin de aislar y lisar el tumor y los glóbulos blancos de la muestra.

Aislamiento y lisis de células tumorales y glóbulos blancos

Mezclar suavemente la muestra de sangre que debe añadirse al dispositivo de filtración invirtiendo lentamente el tubo 4 a 6 veces. Utilizando una pipeta de 1 ml, cargar 1 ml de muestra de sangre a la cámara superior del dispositivo de filtración que se aloja en un tubo de recolección. Tras cargar la muestra, cerrar a presión el dispositivo de filtración. El aparato de aislamiento celular se introduce en una centrifuga Allegra 6R y se centrifuga durante 15 minutos a 1.000

rpm a 4°C. Tras la centrifugación, se saca el aparato de aislamiento celular de la centrifuga. El primer tubo de recolección que contiene los glóbulos rojos se retira de la unidad de filtración y se sustituye por un segundo tubo de recolección limpio. El primer tubo de recolección que contiene sangre se cierra con un tapón por seguridad y se mantiene a temperatura ambiente para la utilización posterior.

5 Se añaden 200 µl de tampón de lisis (mantenido sobre hielo) a la cámara superior del dispositivo de filtración que contiene la membrana con los glóbulos blancos y después se cierra la unidad a presión. El aparato de aislamiento celular se sitúa sobre una plataforma vibratoria (giratoria) que se mantiene a 4°C. La plataforma vibratoria conjuntamente con el aparato de aislamiento celular se somete a tres ciclos que comprenden agitación durante 2 minutos y después reposo durante 5 minutos en cada ciclo. A continuación, el aparato de aislamiento celular se centrifuga a 2.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El lisado celular en el segundo tubo de recolección se transfiere a un tubo de centrifugación de 2 ml con una pipeta de 1 ml para la utilización en inmunoensayos CEER, tal como el ensayo de BCR-ABL y otro ensayo de marcador de ruta. Opcionalmente, el lisado celular se almacena a -70°C.

15 Ejemplo 3. Aislamiento y recolección de leucocitos mediante el método de filtración a partir de sangre completa sin dilución del fármaco anticáncer.

El ejemplo ilustra un protocolo para el aislamiento y lisis de leucocitos a partir de sangre completa del paciente utilizando un método de filtración. Además de los leucocitos sanos normales, pueden aislarse leucocitos malignos, tales como células tumorales de leucemia mielógena crónica (LMC) a partir de la sangre completa sin diluir las concentraciones del fármaco y sin niveles interfirientes de glóbulos rojos contaminantes. En determinadas realizaciones, la sangre completa del paciente puede tratarse *in vitro* o no tratarse con uno o más inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos), previamente al aislamiento. La leucemia mielógena crónica es un cáncer de los glóbulos blancos. Es una forma de leucemia caracterizada por el crecimiento incrementado y regulado positivamente de células predominantemente mieloides en la médula ósea y la acumulación de estas células en la sangre. Por lo tanto, la determinación del nivel de marcadores oncogénicos en los tumores de LMC en los pacientes mediante la extracción de las células tumorales conjuntamente con los leucocitos, separándolos de un número significativo de glóbulos rojos y plasma en la sangre, resulta crucial para las evaluaciones diagnósticas y pronósticas. El presente ejemplo describe un método de filtración que permite recuperar leucocitos y/o células tumorales circulantes de la sangre del paciente sin dilución del fármaco anticáncer.

35 Típicamente se extrae sangre del paciente en tubos de recolección de sangre que contienen EDTA u otros anticoagulantes y se mezcla suavemente mediante inversión. La muestra de sangre se almacena a temperatura ambiente y se procesa dentro de las 24 a 72 horas siguientes y típicamente no se refrigera ni congela. El tubo que contiene la sangre completa se mezcla mediante inversión suave y se trata con una solución mezcla que comprende inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa. La solución mezcla puede comprender ortovanadato sódico (200 mM, a una concentración final de 2 mM), inhibidor de proteasas Sigma (50x, a una concentración final de 1x) e inhibidor de fosfatasas Halt (100x, a una concentración final de 2x) y se mezcla con la muestra de sangre del paciente. Entre los ejemplos de inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, cóctel Halt de inhibidores de proteasas y de fosfatasas (Therma Scientific), juego de inhibidores de proteasas completo ULTRA y PhosSTOP (Roche Applied Science) (EMD Chemicals) y cóctel inhibidor de fosfatasas juego I-IV (EMD Chemicals).

Se utiliza un aparato de aislamiento celular para separar los glóbulos rojos de otras células, tales como leucocitos y/o células tumorales circulantes en muestras de sangre de pacientes. El aparato de aislamiento celular comprende un dispositivo de filtración y un recipiente de recolección tal como se ilustra. En determinados aspectos, el dispositivo de filtración se ensambla mediante inserción de una o más (por ejemplo una pluralidad de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) membranas de filtración retenedoras de leucocitos entre la cámara superior y la cámara inferior del dispositivo de filtración. La membrana de filtración puede presentar un tamaño de poro de 8 µm y un grosor de entre 355,6 y 558,8 µm y un rendimiento de retención de leucocitos de entre 70% y 80%. Un ejemplo no limitativo de una membrana de filtración incluye medio de aislamiento de glóbulos blancos (Leukosorb) (PALL nº de cat. BSP0669). El dispositivo de filtración ensamblado se sitúa en la parte superior de un recipiente de recolección. El aparato de aislamiento celular se destapa antes de cargar la muestra de sangre en el mismo. Entre los ejemplos de recipientes de recolección se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, tubos de cultivo de plástico con una capacidad de 3 ml, 5 ml, 8 ml, 14 ml o 16 ml.

60 Un método ejemplar de aislamiento y lisado de leucocitos y/o células tumorales circulantes de una muestra de sangre del paciente incluye las etapas siguientes. Un ml de muestra de sangre pretratada con inhibidores de proteasa e inhibidores de fosfatasa se mezcla suavemente mediante inversión. A continuación, se carga 1 ml de la muestra de sangre en la cámara superior del aparato de aislamiento celular ensamblado tal como se ha indicado anteriormente. El aparato de aislamiento celular se introduce en una centrifuga clínica o de laboratorio, tal como una centrifuga Allerga 6R (Beckman), centrifuga Sorvall Legend (Thermo Scientific) o centrifuga Heraeus Megafuge (Kendro). Típicamente,

las células se centrifugan durante 5 a 30 minutos a 600-2.000 rpm (por ejemplo a 800 rpm) a 4°C. Pueden utilizarse adaptadores durante la centrifugación para fijar el aparato de aislamiento celular al rotor de la centrifuga. Tras la centrifugación, se saca el aparato de aislamiento celular de la centrifuga y se separa el dispositivo de filtración del recipiente de recolección que contiene glóbulos rojos que han pasado a través del dispositivo de filtración. El recipiente de recolección con los glóbulos rojos puede cerrarse con un tapón por bioseguridad y reservarse.

En determinadas realizaciones, un nuevo recipiente de recolección, tal como, aunque sin limitación, otro tubo de recolección o un tubo de microcentrifuga, se sitúa bajo el dispositivo de filtración. Sin la adición de etapas de lavado, se añadieron 200 µl-1 ml de tampón de lisis a la cámara superior del dispositivo de filtración. Se tapó la cámara superior y el dispositivo de filtración y el nuevo recipiente de recolección se agitaron vigorosamente durante 15 a 30 minutos a 4°C. El dispositivo de filtración y el nuevo recipiente de recolección se introdujeron en una centrifuga, tal como una microcentrifuga, y se centrifugaron a aproximadamente 3.000 rpm durante aproximadamente 5 minutos. El lisado celular puede transferirse a otro recipiente de centrifuga, tal como un tubo de microcentrifuga para el almacenamiento a -70°C.

En otra realización, tras sacar el aparato de aislamiento celular de la centrifuga y separar el dispositivo de filtración del tubo de recolección que contenía los glóbulos rojos, se aisló la membrana o pluralidad de membranas de filtración entre las cámaras superior e inferior del dispositivo de filtración. Se separaron las cámaras superior e inferior (por ejemplo se desenroscaron) y se aislaron las membranas de filtración utilizando unas pinzas. Se introdujeron las membranas en un nuevo recipiente de recolección, tal como un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml o de 2,0 ml, que contenía 1 ml de tampón de lisis celular. Para lisar las células sobre las membranas de filtración, el nuevo recipiente de recolección se agitó con vórtex inmediatamente. A continuación, el recipiente se dejó sobre hielo y se agitó con vórtex brevemente durante 10 segundos cada 10 minutos durante un total de 30 minutos. A continuación, el lisado celular se transfirió a otro recipiente, tal como un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml o 2,0 ml y se almacenó a -70°C.

Ejemplo 4. Aislamiento de células mediante el método de filtración utilizando un aparato de aislamiento celular de 96 pocillos.

El presente ejemplo demuestra la recuperación de células aisladas a partir de una muestra, tal como, por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, orina, esputo, líquido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado de pezón, linfa, saliva y/o aspirado con aguja fina (AAF) utilizando un método de filtración o un método de filtración conjuntamente con la captura en perlas magnéticas, en el que las células aisladas pueden utilizarse en la presente invención para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de una o una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o moléculas de transducción de señales (por ejemplo RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, RFCDP, c-Met, c-KIT, IGF-1R, SHC, PI3K, etc.). En particular, el presente ejemplo demuestra la recuperación de células K562 (es decir, células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana) a partir de sangre con adición puntual de células K562 utilizando un método de filtración solo o un método de filtración tras la captura en perlas magnéticas con anticuerpos anti-CD45, seguido de la preparación de un lisado de células K562 y la determinación de la expresión y/o estado de activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL), sustratos de las mismas, rutas de las mismas, o combinaciones de las mismas. El presente ejemplo demuestra además la recuperación de un subgrupo de células sanguíneas (es decir, leucocitos) de muestras de sangre del paciente utilizando un método de filtración o un método de filtración previamente a la captura con perlas magnéticas con anticuerpos anti-CD45, seguido de la preparación de un lisado celular y la determinación de la expresión y/o estado de activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL), sustratos de las mismas, rutas de las mismas o combinaciones de las mismas. Mediante la eliminación de la necesidad de ninguna etapa de lavado tras la recolección de muestras del paciente y el aislamiento celular, los métodos descritos en la presente memoria resultan ventajosos debido a que las células de interés pueden recuperarse a partir de la sangre sin modificar la concentración intracelular de fármaco anticáncer, tal como un inhibidor de tirosina quinasa. Al contrario que en la técnica conocida, los métodos descritos en el presente ejemplo proporcionan lisados celulares a partir de células recuperadas sin dilución sustancial de un fármaco anticáncer, tal como un inhibidor de tirosina quinasa (por ejemplo Gleevec[®], Tasigna[®], Sprycel[®], etc.).

Puede prepararse una placa de aislamiento celular de 96 pocillos para aislar los leucocitos y/o células K562 a partir de sangre recién recolectada. En primer lugar, la membrana original de una placa de filtración de 96 pocillos puede sacarse y sustituirse por membranas de filtración (por ejemplo LeukoLOCK (Life Technologies) o Acroprep (PALL) y Leukosorb (PALL)). En dichas realizaciones, puede cargarse sangre recién recolectada con o sin adición puntual de células K562 en los pocillos de una placa de aislamiento celular de 96 pocillos. Una segunda microplaca de 96 pocillos puede servir de placa de recolección de residuos sanguíneos y debe situarse bajo la placa de aislamiento celular con membranas de filtración. Este ensamblaje de placas puede centrifugarse a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min. a una velocidad comprendida entre aproximadamente 600 rpm y 3.000 rpm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 600 rpm, 1.000 rpm, 2.000 rpm y 3.000 rpm. Tras la centrifugación, la membrana de filtración puede transferirse a un tubo de centrifugación y las células sobre la membrana de filtración pueden tratarse con un volumen de tampón de lisis (por ejemplo 300 µl de tampón de lisis) y agitarse con vórtex brevemente e inmediatamente con el fin de lisar las células. El tubo de centrifugación que contiene el lisado celular puede dejarse sobre hielo durante aproximadamente 30 minutos y someterse a una breve agitación con vórtex aproximadamente

5 cada 10 minutos. El tubo puede centrifugarse durante aproximadamente 15 minutos para separar los residuos celulares del sobrenadante. El sobrenadante que contiene el lisado puede recolectarse y analizarse mediante micromatrices, tal como un inmunoensayo mediado por proximidad para detectar proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o moléculas de transducción de señales (por ejemplo RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, RFCDP, c-Met, c-KIT, IGF-1R, SHC, PI3K, etc.).

10 La sangre recién recolectada con o sin adición puntual de células K562 puede someterse al método de filtración para el aislamiento celular indicada en la presente memoria, tras el procesamiento inicial mediante captura con perlas magnéticas con anticuerpos anti-CD45. La sangre recién recolectada con o sin adición puntual de células K562 puede
15 incubarse con perlas magnéticas lavadas y acopladas con anticuerpos anti-CD45 (por ejemplo Dynalbeads CD45 (Invitrogen)). Pueden prepararse perlas magnéticas lavadas siguiendo las instrucciones del fabricante. Por ejemplo, el procedimiento puede incluir las etapas siguientes: 1) transferir 100 µl de perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD45 a un tubo de centrifuga de 1,5 ml, 2) añadir 1 ml de tampón y mezclar suavemente, 3) situar el tubo de centrifuga sobre un imán durante 1 min., 4) separar el sobrenadante, y 5) retirar el tubo del imán y resuspender las perlas magnéticas en 100 ml de tampón. En casos particulares, pueden añadirse 100 ml de las perlas lavadas a cada una de las muestras de sangre con adición puntual de K562. A continuación, las muestras pueden incubarse en una centrifuga en una sala fría a 4°C o a temperatura ambiente durante un tiempo de entre aproximadamente 20 min. y 2 horas. El tiempo de incubación puede ser, por ejemplo, de como mínimo 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas o 2 horas. A continuación, las muestras pueden situarse sobre el imán (por ejemplo el imán DynaMag). Puede recolectarse el sobrenadante y cargarse en los pocillos de una placa de aislamiento celular de 96 pocillos. El método de aislamiento celular mediante filtración puede llevarse a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

25 Puede aislarse un subgrupo de células sanguíneas (por ejemplo leucocitos) a partir de muestras de sangre de paciente con LMC recién recogidas, mediante el método de filtración indicado en la presente memoria. En casos particulares, pueden recolectarse muestras de sangre de pacientes con LMC bajo medicación con inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec®), nilotinib (Tasigna®), dasatinib (Sprycel®), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW572016; Tykerb®), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima™; ZD6474) y combinaciones de los mismos). Una ventaja de la presente invención es que las muestras de sangre de los pacientes, incluyendo las de pacientes que están recibiendo terapia de tirosina quinasa, no requieren un lavado o procesamiento adicional. De manera similar tal como se ha indicado anteriormente, puede prepararse una placa de aislamiento celular de 96 pocillos extrayendo la membrana original de una placa de filtración de 96 pocillos y sustituyéndola por una membrana de filtración (por ejemplo LeukoLOCK (Life Technologies) o Acroprep (PALL)) capaz de capturar las células sanguíneas de interés (por ejemplo leucocitos). La sangre recién recolectada de un paciente con LMC puede cargarse en los pocillos de una placa de aislamiento celular de 96 pocillos y una segunda microplaca de 96 pocillos puede situarse bajo la placa de aislamiento celular con membranas de filtración. El ensamblaje de placas puede centrifugarse a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min. a una velocidad comprendida entre aproximadamente 600 rpm y 3.000 rpm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 600 rpm, 1.000 rpm, 2.000 rpm y 3.000 rpm. Tras la centrifugación, la membrana de filtración puede transferirse a un tubo de centrifugación. Para lisar las células, pueden añadirse aproximadamente 300 µl de tampón de lisis al tubo y después el tubo puede agitarse con vórtex brevemente. El tubo que contiene el lisado celular puede dejarse sobre hielo durante aproximadamente 30 min. y someterse a una breve agitación con vórtex aproximadamente cada 10 minutos. El tubo puede centrifugarse durante aproximadamente 15 minutos para separar los residuos celulares del sobrenadante. El sobrenadante que contiene el lisado puede recolectarse y analizarse mediante un ensayo de micromatrices, tal como un inmunoensayo mediado por proximidad descrito en la presente memoria.

50 La sangre recién extraída de un paciente con LMC puede procesarse inicialmente mediante captura en perlas magnéticas con anticuerpos anti-CD45 previamente al método de filtración para el aislamiento celular descrito en la presente memoria. En determinadas realizaciones, las perlas magnéticas lavadas y acopladas con anticuerpos anti-CD45 (por ejemplo Dynalbeads CD45 (Invitrogen)) pueden incubarse con sangre recolectada de pacientes con LMC. Las perlas magnéticas lavadas pueden prepararse siguiendo las instrucciones del fabricante, por ejemplo el procedimiento puede incluir las etapas siguientes: 1) transferir 100 µl de perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD45 a un tubo de centrifuga de 1,5 ml, 2) añadir 1 ml de tampón y mezclar suavemente, 3) situar el tubo de centrifuga sobre un imán durante 1 min., 4) separar el sobrenadante, y 5) retirar el tubo del imán y resuspender las perlas magnéticas en 100 µl de tampón. En casos particulares, pueden añadirse 100 ml de las perlas lavadas a cada una de las muestras de sangre con adición puntual de K562. A continuación, las muestras pueden incubarse en una centrifuga en una sala fría a 4°C o a temperatura ambiente durante un tiempo de entre aproximadamente 20 min. y 2 horas. El tiempo de incubación puede ser, por ejemplo, de como mínimo 20 minutos, 30 minutos, 1 hora, 1,5 horas o 2 horas. A continuación, las muestras pueden situarse sobre el imán. Puede recolectarse el sobrenadante y cargarse en los pocillos de una placa de aislamiento celular de 96 pocillos. El método de aislamiento celular mediante filtración puede llevarse a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

65 La FIG. 7 ilustra que BCR-ABL tanto total como fosforilado puede detectarse y medirse en lisados celulares preparados a partir de células K562 aisladas de muestras de sangre con adición puntual de células K562 y mediante la utilización del método de filtración de leucocitos de la presente invención. La FIG. 7A muestra que los niveles de

BCR-ABL total en las células tras la filtración eran similares a los niveles observados en muestras no filtradas. Además, la FIG. 7B muestra que los niveles de BCR-ABL fosforilado en las células K562 tras la filtración son comparables a los niveles detectados en células no procesadas.

5 La FIG. 8A-B ilustra que los niveles de BCR-ABL tanto total como fosforilado se detectaron y se midieron en los lisados celulares, en los que se prepararon los lisados celulares a partir de muestras de sangre con adición puntual de células K562, se filtraron a través de membranas de filtración y se analizaron mediante micromatrices, tal como un ensayo de proximidad, tal como un inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n° 2010/0167945. En particular, se utilizaron 5.000 células aisladas mediante los métodos descritos en la presente memoria, en un ensayo CEER de BCR-ABL. Se comparó el porcentaje de recuperación de BCR-ABL total y fosforilado en diferentes muestras que habían sido centrifugadas a diversas velocidades. La FIG. 8A muestra que se alcanzó una recuperación de 141,55% de la señal de BCR-ABL total en células K562 aisladas tras el método de aislamiento celular de la presente invención que incluía un aparato de filtración con membranas de filtración PALL y una etapa de centrifugación a una velocidad de 600 rpm. En comparación, en el caso de que el método de aislamiento celular incluyese membranas de filtración LeukoLock y una etapa de centrifugación a una velocidad de 600 rpm, la recuperación de la señal de BCR-ABL total fue de 128,88%. Notablemente, el porcentaje de recuperación se redujo a 62,71% al incrementar la velocidad de centrifugación a 1.000 rpm. La FIG. 8B muestra que el porcentaje de recuperación de la señal de BCR-ABL fosforilado en células aisladas a partir de muestras de 1 ml de sangre con adición puntual de células K562 y mediante la utilización de los métodos de la presente invención. El 63,60% de la señal de BCR-ABL fosforilada se detectó en células K562 aisladas utilizando el método de filtración, que incluía aislar células con la membrana de filtración PALL y centrifugar el aparato de filtración a 600 rpm. El 59,64% de la señal de BCR-ABL fosforilada se detectó en células K562 aisladas utilizando el método de filtración, que incluía aislar células con la membrana de filtración LeukoLOCK y centrifugar el aparato de filtración a 1.000 rpm. Al reducir la velocidad de centrifugación a 600 rpm, el porcentaje de recuperación se redujo a 57,89% con la membrana LeukoLock.

La FIG. 9A ilustra que los niveles de BCR-ABL fosforilado se detectan y miden en lisados celulares preparados a partir de muestras de sangre con adición puntual de cantidades variables de células K562, filtradas a través de membranas de filtración y analizadas mediante micromatrices, tales como el inmunoensayo mediado por proximidad indicado en la presente memoria. Los métodos de la presente invención se utilizaron para detectar los niveles de fosfo-BCR-ABL en muestras con adición puntual de células K562. En particular, los niveles medidos de BCR-ABL fosforilado se refieren al número de células K562 añadidas a las muestras de sangre. El porcentaje de recuperación de la señal de BCR-ABL fosforilado era de 123,32% para la muestra con adición de 300.000 células K562, 75,21% para la muestra con adición de 100.000 células K562, 63,16% para la muestra con adición de 30.000 células K562 y 159,12% para la muestra con adición de 10.000 células K562.

La FIG. 9B ilustra la señal de BCR-ABL en células K562 recuperadas tras la filtración al añadir las células a sangre. El porcentaje de recuperación de la señal de BCR-ABL fosforilado era de 63,60% para la muestra con adición de 1.000.000 células K562 y el total era de 108,61%.

Ejemplo 5. Protocolo para el aislamiento de células tumorales a partir de sangre de paciente con LMC mediante el método de filtración utilizando un aparato de aislamiento celular de 96 pocillos.

45 El ejemplo ilustra un protocolo para el aislamiento y recolección de células tumorales de leucemia mielógena crónica (LMC) a partir de sangre completa del paciente utilizando un método de filtración. En una realización preferente, la sangre completa del paciente puede tratarse *in vitro* o no tratarse con uno o más inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos), previamente al aislamiento. La leucemia mielógena crónica es un cáncer de los glóbulos blancos. Es una forma de leucemia caracterizada por el crecimiento incrementado y regulado positivamente de células predominantemente mieloides en la médula ósea y la acumulación de estas células en la sangre. El 95% de las células de cáncer de LMC expresan la oncoproteína BCR-ABL. Por lo tanto, la determinación del nivel de BCR-ABL en tumores de LMC en pacientes mediante la extracción de células tumorales conjuntamente con glóbulos blancos separándolos de los glóbulos rojos en la sangre se convierte en crucial. El presente ejemplo describe un método de filtración que permite la recuperación de células tumorales (por ejemplo leucocitos y otros glóbulos blancos) a partir de la sangre del paciente.

60 Típicamente se extrae sangre del paciente en tubos de recolección de sangre que contienen EDTA y se mezcla suavemente mediante inversión. La muestra de sangre completa se almacena a temperatura ambiente y se procesa en máximo 24 horas. La placa de filtración comprende una placa de 96 pocillos con una membrana en el fondo del pocillo que puede permitir la recuperación de los glóbulos blancos (por ejemplo los leucocitos) a partir de la sangre completa. En el caso de que la placa de filtración no se encuentre disponible comercialmente, puede prepararse mediante una serie de etapas, tales como, aunque sin limitación, a) retirar la membrana de filtración original de una

5 placa Unifilter de 96 pocillos de Whatman, b) retirar la membrana de filtración de ARN total LeukoLOCK de su carcasa de cartucho de filtración, c) punzonar un orificio de 0,25 pulgadas de diámetro en la membrana de filtración de ARN total LeukoLOCK de manera que los círculos de membrana recién creados encajen en un pocillo de la placa de filtración de 96 pocillos, y d) introducir cuidadosamente los nuevos círculos de membrana de filtración de ARN total LeukoLOCK en la placa Unifilter de 96 pocillos de Whatman sin su membrana original. A continuación, se sitúa una microplaca de 96 pocillos bajo la placa de filtración de 96 pocillos y ambas placas se sellan entre sí con cinta para formar un doblete de placas de filtración. La microplaca de 96 pocillos sirve para recolectar la sangre que ha pasado.

10 El método de filtración puede incluir las etapas siguientes. Se mezcla una muestra de sangre de paciente con una pipeta de 1 ml pipeteando hacia arriba y hacia abajo 5 a 10 veces. Utilizando una pipeta de 1 ml, se cargan 300 µl de sangre del paciente en un pocillo del doblete de placas de filtración de 96 pocillos pre-fabricada. El doblete de placas se centrifuga en una centrífuga de laboratorio (por ejemplo Allegra 6R (Beckman Coulter)) durante 5 minutos a 3.000 rpm a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, se saca el doblete de placas de la centrífuga. Se retira la cinta y se separan las placas del doblete de placas. Utilizando pinzas de disección de 114 mm (4 1/2"), el círculo de membrana de filtración LeukoLOCK se sacó del pocillo de la placa de filtración y se introdujo en un tubo de centrifugación de 2 ml que contenía 300 µl de tampón de lisis de proteínas. A continuación, el tubo de centrifugación se agita con vórtex inmediatamente. El tubo de centrifugación se dejó sobre hielo y se agitó con vórtex brevemente durante 10 segundos cada 10 minutos durante un total de 30 minutos. El lisado se transfirió a un nuevo tubo de centrifugación de 2 ml utilizando una pipeta de 1 ml. En este punto, el lisado debe almacenarse a -70°C o utilizarse en un ensayo que detecta el estado de activación y/o la cantidad total de una o una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o moléculas de transducción de señales (por ejemplo RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, RFCDP, c-Met, c-KIT, IGF-1R, SHC, PI3K, etc.).

25 El método de filtración puede incluir además las etapas siguientes. Se trata una muestra de sangre del paciente con inhibidores de tirosina quinasa antes de la filtración para recuperar células tumorales (por ejemplo leucocitos y otros glóbulos blancos) de la sangre del paciente. En casos particulares, se transfiere 1,2 ml de sangre de paciente recién recolectada a un tubo de cultivo y se añaden intervalos de concentración específicos de fármacos inhibidores de tirosina quinasa, tales como dasatinib 10 mM, 1 mM o 0,1 mM, imatinib 10 mM, 1 mM o 0,1 mM, y nilotinib 10 mM, 1 mM o 0,1 mM. La sangre se incuba durante aproximadamente 1 a 24 horas (por ejemplo 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 o 24 horas) a 37°C en un incubador de CO₂ o a temperatura ambiente.

Ejemplo 6. Protocolo para una inmuno-micromatriz CEER para la determinación de los niveles de fosfo-BCR-ABL, BCR-ABL total y BCR a partir de muestras de sangre del paciente 2 de las primera y segunda extracciones de sangre.

35 El presente ejemplo ilustra un procedimiento para llevar a cabo una inmuno-micromatriz CEER para detectar la expresión y activación de BCR-ABL en una muestra de sangre del paciente. Se aíslan los leucocitos y células tumorales circulantes siguiendo los métodos descritos en la presente memoria. Se lisan las células aisladas y se utilizan en un ensayo de proximidad, tal como un inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n° 2010/0167945. En realizaciones particulares, el protocolo incluye tratar la muestra de sangre del paciente con perlas magnéticas que se unen a BCR.

Dilución del lisado de células K562 para la inmuno-micromatriz CEER.

45 Se prepararon lisados de células K562 no tratadas, siguiendo los métodos de la presente invención, tal como se indica en los Ejemplos 2 y 3. Se llevaron a cabo diluciones en serie de lisados de células K462 no tratadas en tampón de dilución de ensayo, según la Tabla 1. Los lisados celulares se cribaron mediante tres placas de CEER.

Tabla 1

Densidad final de células	Vol. de células K562	Vol. de tampón de dilución de ensayo	Nº de células/80 µl
125 células/µl	10 µl (5.617 células/µl)	440 µl	10,000
37,5 células/µl	135 µl (125 células/µl)	315 µl	3,000
12,5 células/µl	135 µl (37,5 células/µl)	270 µl	1,000
3,75 células/µl	135 µl (12,5 células/µl)	315 µl	300
1,25 células/µl	135 µl (3,75 células/µl)	270 µl	100
0,375 células/µl	135 µl (1,25 células/µl)	315 µl	30
0,125 células/µl	135 µl (0,375 células/µl)	270 µl	10
0 células/µl	0	450 µl	0

50

Dilución del lisado de células de muestras de sangre del paciente para la inmuno-micromatriz CEER.

Se prepararon lisados celulares a partir de muestras de sangre de los pacientes siguiendo los métodos de la presente invención, tal como se indica en los Ejemplos 1, 2 y 10. El procedimiento de dilución del lisado celular del paciente para

la utilización con tres placas de CEER se ilustra en la Tabla 2.

Tabla 2

	Vol. de lisado	Vol. de tampón de dilución de ensayo	Vol. que debe eliminarse tras la dilución f
Dilución 1:2,5 del lisado	160 µl de lisado celular del paciente agrupado	240 µl	150 µl (incubar con 150 µl de perlas; 1:5)
Dilución 1:5 del lisado	150 µl de dilución 1:2,5	150 µl	
Dilución 1:10 del lisado	75 µl de dilución 1:2,5	225 µl	150 µl (incubar con 150 µl de perlas; 1:20)
Dilución 01:20:00 del lisado	150 µl de dilución 1:10	150 µl	

5 Procedimiento para la inmuno-micromatriz CEER.

1. Placa de bloqueo:

- 10 1.1. Enjuagar la placa 2x con TBST.
 1.2. Bloquear la placa con 80 µl de tampón de bloqueo sin proteínas (TBS) durante 1 h.
 1.3. Lavar 2x con TBST, tras la etapa de bloqueo.
 1.4. Añadir 10 µl de Na₃VO₄ 1 mM por ml de tampón de dilución de ensayo (BSA al 2%/Triton al 0,1%/EDTA 10 mM/TBS).

15 2. Incubación con lisado celular:

- 20 2.1. Realizar la dilución en serie del lisado celular con tampón de dilución de ensayo tal como se indica en las Tablas ## y ##.
 2.2. Extraer una alícuota del lisado celular para la incubación con perlas y añadir un volumen equivalente de tampón de dilución de ensayo a las alícuotas de lisado que no se incubarán con perlas magnéticas (por ejemplo perlas BCR-1684).
 2.3. Añadir 80 µl de lisado celular a la placa y sellarla.
 2.4. Incubar durante la noche a temperatura ambiente.
 25 2.5. Lavar la placa 5x de manera que el primer lavado sea un enjuague rápido con 1,25 ml de TBST y los lavados restantes duren 3 minutos cada uno.

3. Incubación con anticuerpos de detección:

- 30 3.1. Diluir los anticuerpos marcados con las concentraciones apropiadas en tampón de dilución de ensayo.
 3.1.1 4G10-HRP: diluir 1:320 (Millipore nº 05-777)
 3.1.2 BCR-GO-AF5129: diluir 1:80 y 1:160 (R&D nº AF5129)
 3.1.3 Abl-HRP-AF5414: diluir 1:900 (R&D nº AF5414)
 3.1.4 BCR-HRP-1684-B-Dextrano: diluir 1:80 (Epitomics nº 1684-B)
 3.1.5 GO-Dextrano: diluir 1:80
 35 3.2. Añadir 80 µl de solución de anticuerpos a la placa apropiada e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
 3.2.1 Para la placa sin BCR: BCR-HRP 1:80, GO-Dextrano 1:80.
 3.2.2 Para la placa de BCR-ABL total: Abl-HRP 1:900, BCR-GO 1:80.
 3.2.3 Para la placa Fosfo-BCR-ABL: 4G10-HRP 1:320, BCR-GO 1:160.
 40 3.3. Lavar la placa 5x de manera que el primer lavado sea un enjuague rápido con 1,25 ml de TBST y los lavados restantes duren 3 minutos cada uno.

4. Amplificación de señales mediada por tiramida:

- 45 4.1. Añadir 80 µl de biotina-tiramida a una dilución 1:320 en glucosa 50 mM/PBS (para BCR-HRP+GO-Dextrano).
 4.2. Añadir 80 µl de biotina-tiramida a una concentración de 6,25 µg/ml en glucosa 50 mM/PBS-RK (para 4G10-HRP+BCR-GO y AB L-HRP+BCR-GO).
 4.3. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad.
 50 4.4. Lavar la placa 5x de manera que el primer lavado sea un enjuague rápido con 1,25 ml de TBST y los lavados restantes duren 3 minutos cada uno.

5. Incubación con estreptavidina conjugada con Alexa Fluor:

5.1. Incubar con 80 µl de estreptavidina-Alexa 647 a una concentración de 0,4 µg/ml en tampón de dilución de ensayo (dilución 1:4.000) durante 40 minutos.

5.2. Lavar la placa 5x de manera que el primer lavado sea un enjuague rápido con 1,25 ml de TBST y los lavados restantes duren 3 minutos cada uno.

5.3. Lavar una vez con agua.

5.4. Retirar el marco y enjuagar la placa un par de veces con agua. 5.5. Centrifugar la placa a 1.500 rpm en un tubo de 50 ml durante 3 minutos.

6. Secar y escanear la placa en un escáner Perkin Elmer en la configuración del láser adecuada:

6.1. Secar la placa.

6.2. Escanear la placa en un escáner Perkin Elmer en la configuración del láser adecuada

6.3. Guardar las imágenes y juegos de escaneos en archivos y en el servidor.

Ejemplo 7. Método para seleccionar una terapia anticáncer para un paciente con una neoplasia hematológica maligna caracterizada con los niveles de BCR-ABL activado.

El presente ejemplo demuestra un método para seleccionar una terapia anticáncer para un paciente con enfermedades mediadas por BCR-ABL (por ejemplo la leucemia mielógena crónica). Un paciente previamente no tratado para una enfermedad mediada por BCR-ABL y que no ha recibido fármacos tales como inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos). Se extrajo una muestra de sangre del paciente y se incubó con diferentes fármacos anticáncer a dosis variables durante 1,5 horas a 37°C. Tras este tratamiento farmacológico *in vitro*, se recuperaron leucocitos y/o células tumorales circulantes a partir de la sangre del paciente. Se lisan las células aisladas y se utilizan en un ensayo de proximidad, tal como un inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n° 2010/0167945. Los perfiles de ruta, basados en el perfilado de expresión/activación de los analitos de proteínas de ruta de transducción de señales (por ejemplo BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, AKT, SRC) en las muestras de pacientes tratados farmacológicamente, se determinaron en presencia de fármacos anticáncer. Los perfiles se utilizaron para seleccionar un régimen de tratamiento anticáncer destinado a alcanzar un resultado clínicamente positivo.

De esta manera, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer en un sujeto que presenta una neoplasia hematológica maligna, comprendiendo el método: 1) medir el nivel de estado de activación de BCR-ABL en una célula aislada de una muestra del sujeto, 2) incubar la célula aislada con por lo menos un fármaco anticáncer antes del inicio del tratamiento, 3) medir el nivel de estado de activación de BCR-ABL en las células incubadas, y seleccionar un curso de tratamiento basándose en el nivel de estado de activación de BCR-ABL. La presente invención proporciona además un método para el seguimiento de la eficacia de un fármaco anticáncer en un sujeto, en el que el sujeto presenta una neoplasia hematológica maligna, comprendiendo el método: 1) medir el estado de activación de BCR-ABL en T₀, antes de la primera administración del fármaco anticáncer, 2) administrar el fármaco anticáncer en el sujeto, en el que la primera administración del fármaco anticáncer se lleva a cabo en el tiempo T₁, 3) medir el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL en un tiempo T₂ en una muestra del sujeto, y 4) determinar un curso de tratamiento basándose en el estado de activación y/o nivel de expresión de BCR-ABL.

Ejemplo 8. Paciente 1: Perfilado de ruta para determinar la eficacia del tratamiento y/o para seleccionar la mejor estrategia de tratamiento basándose en el perfil de inhibición *in vitro* de BCR-ABL

El presente ejemplo demuestra la determinación de la eficacia de las terapias de inhibidores para pacientes con enfermedades mediadas por BCR-ABL (por ejemplo la leucemia mielógena crónica) basándose en el perfilado de expresión/activación de analitos de proteínas de ruta de transducción de señales (por ejemplo BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, AKT, SRC) en la muestra de sangre del paciente. En casos particulares, los pacientes pueden recibir terapia de inhibidores, tal como el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos). En otras realizaciones, la presencia y/o el estado de activación de un sustrato BCR-ABL, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC puede medirse utilizando un ensayo de proximidad tal como un inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n° 2010/0167945. Además, el perfilado de expresión/activación de quinazinas y otros componentes de la ruta de transducción de señales en la muestra del sujeto tras el tratamiento *in vitro* con inhibidores de tirosina quinasa pueden proporcionar información valiosa que permita al médico seleccionar un régimen terapéutico eficaz.

En un ejemplo ejemplar, se analizaron muestras de sangre de un paciente (paciente nº 1) para determinar la eficacia de la terapia de imatinib del paciente. El paciente 1 era una mujer blanca de 55 años de edad con un diagnóstico primario de leucemia mielógena crónica (LMC). Presentaba LMC activa y había estado recibiendo imatinib desde el diagnóstico. Se extrajo sangre del paciente y se aislaron los leucocitos utilizando métodos indicados anteriormente. Brevemente, la muestra de sangre completa del paciente 1 se filtró a través de una placa de filtración con el fin de recuperar los leucocitos y células tumorales circulantes. A continuación, se lisaron las células y se utilizaron en un ensayo de proximidad (por ejemplo CEER y COPIA) que detecta el estado de activación y/o la cantidad de total de una o de una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o moléculas de transducción de señales (por ejemplo RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, RFCDP, c-Met, c-KIT, IGF-1R, SHC y PI3K). En casos específicos, la serie de dilución de los anticuerpos de captura utilizada en el ensayo de proximidad se diluye 1:5 o 1:20 para alcanzar las concentraciones deseadas. Se determinó el número de glóbulos blancos y el perfil de BCR-ABL fosforilado y otros componentes de la ruta de transducción de señales utilizando el ensayo de proximidad. También se calculó la proporción de señales de fosforilación a partir del análisis y se utilizó para determinar el pronóstico del paciente.

En una realización preferente, la muestra de sangre del paciente puede incubarse *in vitro* con tratamientos de inhibidores antes del aislamiento de leucocitos o células tumorales circulantes. En casos particulares, se trataron muestras de sangre completa recolectadas de pacientes diagnosticados con LMC con inhibidor de BCR-ABL 0,1 mM, 1 mM o 10 mM (por ejemplo imatinib, nilotinib y dasatinib) durante 1,5 horas a 37°C. Los leucocitos o células tumorales circulantes se aislaron a partir de la sangre completa utilizando un método de filtración y se lisaron utilizando técnicas conocidas. A continuación, se utilizaron los lisados celulares en un ensayo de proximidad para determinar el efecto del tratamiento de inhibidor de BCR-ABL sobre el estado de activación y/o la cantidad total de una o de una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o de moléculas de transducción de señales. En determinadas realizaciones, el tratamiento *in vitro* con inhibidores de BCR-ABL puede reducir los niveles de CRKL fosforilado. En determinados casos, la activación de CRKL en una muestra de paciente puede deberse a la activación de BCR-ABL. En todavía otra realización, un inhibidor específico, tal como dasatinib, podría ser capaz de atenuar las formas activadas de AKT, STAT5 y SRC. En otros casos, otros inhibidores tales como imatinib y nilotinib podrían no reducir los niveles de AKT y STAT5 fosforilados en el mismo paciente. En casos particulares, la señalización de AKT y STAT fosforilados podría no ser dependiente del estado de activación de BCR-ABL. En otro aspecto, un paciente que se encuentre actualmente recibiendo imatinib probablemente responderá y deberá recibir una terapia de combinación, tal como imatinib y dasatinib, debido a la expresión/activación atenuada de sustratos de BCR-ABL, tal como CRKL, STAT5 y SRC.

La FIG. 10 describe los pacientes analizados en el presente estudio. El paciente nº 1 presenta LMC activa y ha estado recibiendo tratamiento durante como mínimo 5 años. El paciente nº 2, quien también presenta LMC activa, ha estado recibiendo tratamiento de imatinib durante 1 año. La FIG. 11A-B ilustra que el paciente nº 1 presentaba una cantidad menor de fosfo-BCR-ABL por ml de sangre que el paciente nº 2 (10.979 UC/ml frente a 185.934 UC/ml), lo que sugiere que el paciente nº 1 estaba respondiendo al tratamiento de imatinib. La FIG. 12A-B muestra la detección de los niveles de BCR-ABL total y activado (fosforilado) según determinación mediante un ELISA de tipo sándwich, tras el aislamiento mediante filtración de los leucocitos y otras células tumorales circulantes. El ensayo de proximidad puede detectar los niveles de fosfoBCR-ABL en las células K562. La FIG. 13A-B muestra que el tratamiento *in vitro* con imatinib de la muestra de sangre del paciente nº 1 redujo drásticamente la cantidad de BCR-ABL fosforilado, en comparación con el tratamiento de nilotinib. Las FIGS. 14 y 15 muestran que los niveles de BCR-ABL activado en la muestra de sangre del paciente nº 1 resultaron modificados al tratarlos con cantidades crecientes de inhibidor de BCR-ABL. En el presente experimento, se trataron muestras de sangre del paciente nº 1 durante 1,5 horas *in vitro* con cantidades variables de inhibidores de BCR-ABL (por ejemplo imatinib 10 mM, 1 mM o 0,1 mM, o nilotinib 10 mM, 1 mM o 0,1 mM). Los resultados demuestran que la señal de fosfo-BCR-ABL media era de 84 UC para el imatinib 10 mM, de 26 UC para el imatinib 1 mM y de 110 UC para el imatinib 0,1 mM. El nivel medio de la señal de BCR-ABL activado era de 47 UC para el nilotinib 10 mM, de 61 UC para el nilotinib 1 mM y de 306 UC para el nilotinib 0,1 mM. La FIG. 15A-B muestra que el imatinib resulta más eficaz que el nilotinib en la reducción de la proteína BCR-ABL activada en la muestra de sangre del paciente nº 1. El porcentaje de recuperación de señal de BCR-ABL activado era de -18,46% en la muestra tratada *in vitro* con imatinib 1 mM y de 19,15% en la muestra expuesta a nilotinib 1 mM (FIG. 15B). La FIG. 16A-D ilustra el perfil de ruta de otros componentes fosforilados de la ruta de transducción de señales, tales como CRKL (A), AKT (B), STAT5 (C) y SRC (D). Muestra que la terapia de dasatinib, y no de imatinib o nilotinib, resulta en niveles reducidos de AKT, STAT4 y SRC activados en la muestra de sangre del paciente nº 1; la FIG. 17 muestra que la muestra de sangre del paciente nº 1 contenía niveles muy elevados de BCR total (8 millones de UC/ml).

Ejemplo 9. Paciente 2: perfilado de ruta para determinar la eficacia del tratamiento y/o para seleccionar la mejor estrategia de tratamiento basándose en el perfil de inhibición *in vitro* de BCR-ABL

El presente ejemplo demuestra la determinación de la eficacia de las terapia de inhibidores para pacientes con enfermedades mediadas por BCR-ABL (por ejemplo la leucemia mielógena crónica) basándose en el perfilado de expresión/activación de analitos de proteínas de ruta de transducción de señales (por ejemplo BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, AKT o SRC) en la muestra de sangre del paciente. En casos particulares, el paciente puede estar recibiendo terapia de inhibidor, tal como el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib

(Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24534) y combinaciones de los mismos). En otras realizaciones, la presencia y/o el estado de activación de un sustrato BCR-ABL, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC puede medirse utilizando un ensayo de proximidad tal como un inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n° 2010/0167945. Además, el perfilado de expresión/activación de quinasas y otros componentes de la ruta de transducción de señales en la muestra del sujeto tras el tratamiento *in vitro* con inhibidores de tirosina quinasa pueden proporcionar información valiosa que permita al médico seleccionar un régimen terapéutico eficaz.

En un ejemplo ejemplar, el paciente (paciente n° 2) es un hombre blanco de 39 años diagnosticado con LMC en enero. El paciente n° 2 había estado recibiendo imatinib desde el diagnóstico y presentaba enfermedad activa. En una realización preferente, se extrajo sangre del paciente y se aislaron los leucocitos utilizando métodos indicados anteriormente. Brevemente, la muestra de sangre completa del paciente 2 se filtró a través de una placa de filtración con el fin de recuperar los leucocitos y células tumorales circulantes. A continuación, se lisaron las células y se utilizaron en un ensayo de proximidad (por ejemplo CEER y COPIA) que detecta el estado de activación y/o la cantidad total de una o de una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o moléculas de transducción de señales (por ejemplo RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, RFCDP, c-Met, c-KIT, IGF-1R, SHC y PI3K). En casos específicos, la serie de dilución de los anticuerpos de captura utilizada en el ensayo de proximidad puede diluirse 1:5 o 1:20 para alcanzar las concentraciones deseadas. Puede determinarse el número de glóbulos blancos y el perfil de BCR-ABL fosforilado y otros componentes de la ruta de transducción de señales utilizando el ensayo de proximidad. La proporción de señales de fosforilación también puede calcularse a partir del análisis y utilizarse para determinar el pronóstico del paciente.

En una realización preferente, la muestra de sangre del paciente puede incubarse *in vitro* con tratamientos de inhibidores antes del aislamiento de leucocitos o células tumorales circulantes. En casos particulares, se trataron muestras de sangre completa recolectadas de pacientes diagnosticados con LMC con inhibidor de BCR-ABL 1 μ M (por ejemplo imatinib, nilotinib y dasatinib) durante 1,5 horas a 37°C. Los leucocitos o células tumorales circulantes se aislaron a partir de la sangre completa utilizando un método de filtración y se lisaron utilizando técnicas conocidas. A continuación, se utilizaron los lisados celulares en un ensayo de proximidad para determinar el efecto del tratamiento de inhibidor de BCR-ABL sobre el estado de activación y/o la cantidad total de una o de una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o de moléculas de transducción de señales. En determinadas realizaciones, el tratamiento *in vitro* con nilotinib, y no con imatinib, reducirá el porcentaje de fosfo-BCR-ABL recuperado en la muestra de sangre del paciente. En un caso particular, un paciente con dicho perfil de ruta probablemente responderá mejor a la terapia de nilotinib que a imatinib. En otras realizaciones, el tratamiento *in vitro* con inhibidores de BCR-ABL podría no presentar ningún efecto sobre CRKL fosforilado. En otra realización, un inhibidor específico, tal como dasatinib, podría ser capaz de atenuar las formas activadas de AKT, STAT5 y SRC. En otros casos, otros inhibidores tales como imatinib y nilotinib podrían reducir los niveles de AKT fosforilado en la misma muestra del paciente. En todavía otro caso, STAT5 y SRC fosforilados se reducen en aproximadamente 20% debido al tratamiento *in vitro* con imatinib y nilotinib. En otro aspecto, un paciente que se encuentre actualmente recibiendo imatinib probablemente responderá mejor y debería recibir una terapia de dasatinib debido a la expresión/activación atenuada de sustratos de BCR-ABL, tal como AKT, STAT5 y SRC.

La FIG. 18A-B muestra la detección y medición de BCR-ABL fosforilado tras el tratamiento *in vitro* de las muestras de sangre del paciente n° 2 con diferentes dosis de inhibidores de BCR-ABL durante 1,5 horas a 37°C. También muestra que el nilotinib resultó más eficaz que el imatinib en la reducción del nivel de BCR-ABL activado en muestras de sangre tratadas *in vitro* del paciente n° 2. El incremento de la concentración del nilotinib (por ejemplo 0,1 mM, 1 mM y 10 mM) redujo el nivel de BCR-ABL activado, mientras que la modificación de la concentración del imatinib presentó un menor efecto (FIG. 18B). El imatinib presentó muy poco efecto sobre los niveles de BCR-ABL activado en el paciente n° 2. La FIG. 19A-D muestra que el tratamiento *in vitro* de muestras de sangre del paciente 2 con dasatinib redujo los niveles de AKT (B), STAT5 (C) y SRC (D) activados. Por otra parte, el tratamiento similar con imatinib o nilotinib redujo únicamente AKT fosforilado (por ejemplo 55,54% en la muestra de tratamiento de imatinib 10 mM en comparación con 100% en la muestra no tratada).

Ejemplo 10. Comparación de los perfiles de ruta de muestras de sangre de pacientes tratados con imatinib por leucemia mielógena crónica

El ejemplo demuestra que los perfiles de ruta basados en el perfilado de expresión/activación de los analitos de proteínas de ruta de transducción de señales (por ejemplo BCR-ABL, BCR, ABL, CRKL, AKT y SRC) en la muestra de sangre del sujeto puede ser determinada y comparada para establecer la eficacia de los diversos regímenes terapéuticos. En una realización preferente, la presencia y/o el estado de activación de un sustrato BCR-ABL, tal como CRKL, AKT, STAT5 y SRC puede medirse utilizando un ensayo de proximidad tal como un inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n°

2010/0167945. En otras realizaciones, los pacientes pueden recibir terapia de inhibidores, tal como el tratamiento con inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo mesilato de imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Spryzel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]), erlotinib (Tarceva[®]), lapatinib (GW572016; Tykerb[®]), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar[®]), leflunómido (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), ponatinib (AP24535) y combinaciones de los mismos). En otras realizaciones, las muestras de sangre del paciente pueden tratarse con inhibidores de tirosina quinasa *in vitro* durante 1,5 horas a 37°C. Después, pueden recuperarse las células tumorales circulantes y/o leucocitos a partir de la muestra de sangre utilizando métodos de filtración indicados en la presente memoria. Las células aisladas pueden lisarse y utilizarse en un ensayo de proximidad (por ejemplo CEER y COPIA) que detecta el estado de activación y/o la cantidad total de una o de una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo BCR-ABL) y/o moléculas de transducción de señales (por ejemplo RFCE, HER-2, HER-3, HER-4, RFCEV-1, RFCEV-2, RFCEV-3, RFCDP, c-Met, c-KIT, IGF-1R, SHC, PI3K, CRKL, AKT, STAT5 y SRC). Los niveles medidos de estas proteínas pueden compararse entre muestras del mismo paciente o de otros pacientes. La comparación entre los perfiles de ruta permite al médico seleccionar la terapia más eficaz para un paciente con una enfermedad mediada por BCR-ABL.

La FIG. 20A-D muestra que los niveles de CRKL fosforilado fueron detectados y medidos en muestras de sangre que también habían sido tratadas con inhibidores de tirosina quinasa *in vitro*. En el presente experimento, los anticuerpos de captura utilizados en los ensayos de proximidad se diluyeron 1:10 o 1:50 para alcanzar las concentraciones deseadas. El paciente n° 1 mostró niveles más altos de CRKL activado que el paciente n° 2. Los inhibidores de BCR-ABL, tales como el imatinib y el nilotinib, redujeron los niveles de CRKL únicamente en muestras de sangre del paciente n° 1, y no del paciente n° 2.

La FIG. 21A-D ilustra que el paciente n° 1 y el paciente n° 2 no responden de manera similar al imatinib y al nilotinib. Los niveles de AKT activado se incrementando en las muestras del paciente n° 1 tras el tratamiento de imatinib y sin embargo se reducen en muestras del paciente n° 2. En respuesta al nilotinib, los niveles de AKT permanecieron mayoritariamente sin cambios en muestras del paciente n° 1 y se redujeron en gran medida en las muestras del paciente n° 2.

La FIG. 22A-B muestra que el tratamiento de dasatinib *in vitro* puede reducir los niveles de fosfo-STAT5 en muestras del paciente n° 1 (A) y n° 2 (B). Los niveles de STAT5 activado eran similares en muestras del paciente n° 1 o en el paciente n° 2 que no habían recibido tratamiento, imatinib 10 mM y nilotinib 10 mM.

La FIG. 23A-D muestra que las muestras de tanto el paciente n° 1 como el paciente n° 2 presentaban niveles más bajos de fosfo-SRC en respuesta a imatinib, nilotinib y dasatinib. El dasatinib resultó más eficaz en la reducción de los niveles de fosfo-SRC en comparación con el imatinib y el nilotinib en muestras de tanto el paciente n° 1 como del paciente n° 2.

Ejemplo 11. Detección y seguimiento de la activación de BCR-ABL en pacientes de LMC.

El presente ejemplo ilustra los métodos de la presente invención de seguimiento de la respuesta al tratamiento en un paciente diagnosticado con LMC. El presente ejemplo ilustra que los métodos pueden detectar la expresión y el estado de activación de múltiples proteínas de un número limitado de células. El presente ejemplo muestra que los métodos para la utilización del aparato de aislamiento celular de la presente invención y el inmunoensayo CEER proporcionan un análisis más sensible y cuantitativo de las modulaciones de la diana funcional comparado con el análisis basado en el ARNm.

Entre los métodos tradicionales de seguimiento de la respuesta al tratamiento de la LMC se incluyen los ensayos citogenéticos, la evaluación mediante frotis a partir del aspirado de la médula ósea, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés) del cromosoma Ph y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (Q-PCR). Típicamente, los ensayos citogenéticos o la evaluación de frotis de aspirados óseos se llevan a cabo a las 3, 6 y 12 meses del tratamiento o hasta alcanzar una RCiC. Actualmente la Q-PCR es el ensayo más sensible para la respuesta al tratamiento. La presente invención proporciona métodos para el seguimiento de las modulaciones *in vivo* de la inhibición de la quinasa de BCR-ABL que son más sensibles que la Q-PCR y que no requieren la extracción o dilución del fármaco en la muestra de sangre del paciente.

En el presente estudio, se analizaron los niveles de BCR-ABL total y activado de pacientes de LMC utilizando los métodos de la presente invención. La FIG. 24 representa una tabla de pacientes evaluados en el presente estudio. Se registró la fecha del diagnóstico y el curso de tratamiento del paciente. Se extrajo sangre en diversos puntos temporales durante el curso del estudio. Se aislaron leucocitos y células tumorales circulantes de muestras de sangre del paciente y se lisaron según los métodos indicados en la presente memoria. Se procesó el lisado celular y se analizó mediante los métodos indicados en el Ejemplo 6. Se determinaron las modulaciones de la expresión y la activación de BCR-ABL y de otras moléculas de señalización (por ejemplo AKT, SRC, CRKL y STAT5) en la muestra de sangre del paciente utilizando un ensayo de proximidad (por ejemplo COPIA o CEER). Se proporcionan descripciones detalladas de un ensayo de proximidad, tal como el inmunoensayo Collaborative Proximity Immunoassay (COPIA) descrito en la solicitud de patente PCT n° PCT/US2010/042182, presentada el 15 de julio de 2010, y las publicaciones de patente US

n° 2008/0261829, n° 2009/0035792 y n° 2010/0167945.

Seguimiento de la progresión de la LMC en pacientes que siguen tratamiento farmacológico.

5 La FIG. 25 representa los niveles de BCR-ABL total y activado detectados en muestras de paciente utilizando los métodos de la presente invención. Se presentan datos adicionales de las muestras de pacientes en el presente ejemplo.

10 Se determinaron los niveles de BCR total, ABL y BCR-ABL de una muestra de sangre de un sujeto sano normal. Tal como se esperaba, los niveles de BCR-ABL eran negativos (ver la FIG. 26).

15 El paciente n° 1 fue diagnosticado con LMC en diciembre de 2006 y recibió tratamiento de imatinib (Gleevec). Para determinar la respuesta del paciente n° 1 al imatinib, se analizaron los niveles de BCR-ABL total y activado en tres puntos temporales (1/31, 4/25 y 10/24). El paciente n° 1 presentaba una proporción de BCR-ABL fosforilado/glóbulos blancos de 0,130 en el punto temporal 1, una proporción de 0,133 en el punto temporal 2 y una proporción de 0,078 en el tercer punto temporal (FIG. 27A). El cambio en los niveles de BCR-ABL fosforilado con los puntos temporales no se detectó mediante el ensayo de expresión de ARNm, ya que los valores de ARNm fueron de 0,04+0,01% y de 0,04% en los puntos temporales 2 y 3, respectivamente. El ensayo de expresión del ARN detecta las células tumorales activas a una reducción logarítmica de tres unidades respecto a un valor de línea base estándar. La ventaja de la inmuno-micromatriz CEER es que detecta fosfo-BCR-ABL a una reducción logarítmica superior a tres unidades.

25 Los resultados del paciente n° 7 muestran que los niveles de ARNm de BCR-ABL eran indetectables, pero los niveles de BCR-ABL total y activado fueron detectados utilizando la inmuno-micromatriz CEER. El método de la presente invención demostró ser 10x más sensible en la detección de BCR-ABL activado que BCR-ABL total. En particular, el inmunoensayo CEER detecta la expresión y el estado de activación de BCR-ABL en pacientes con una proporción de células tumorales activas a glóbulos blancos totales de 0,05%, que corresponde a una reducción logarítmica superior a cuatro unidades respecto a un valor de línea base estándar. El paciente n° 7 fue diagnosticado con LMC en mayo e inició el tratamiento de imatinib en abril. La respuesta al tratamiento se siguió en dos puntos temporales posteriores al tratamiento (por ejemplo junio y febrero). Los resultados demuestran que los niveles fosfo-BCR-ABL se redujeron con el tiempo (ver el gráfico de columnas y el gráfico lineal de la FIG. 27B).

35 El paciente n° 2 fue diagnosticado en enero y recibió tratamiento de imatinib en febrero. Se aislaron leucocitos y CTC del paciente y se aislaron y lisaron utilizando la realización de 96 pocillos del aparato de aislamiento celular de sangre extraída el 2/2 y 3/2. La realización de tubo del aparato de aislamiento celular de la presente invención se utilizó para la sangre extraída el 10/12 y el 12/21. Utilizando métodos de la presente invención se determinó que el paciente n° 2 expresaba un nivel más bajo de BCR-ABL activado en el punto temporal de mayo (ver, por ejemplo, el gráfico de columnas y el gráfico lineal de la FIG. 28A, B). Sin embargo, el nivel se incrementó llegado octubre. Los resultados del inmunoensayo CEER se correlacionan con los datos de expresión de ARNm. La exactitud de la Q-PCR utilizando métodos estándares (por ejemplo el kit MolecularMD para BCR-ABL) y los niveles bajos de ARNm se subrayan en la FIG. 28C. El porcentaje de BCR-ABL/ABL variaba con la cantidad de ARNm presente en la muestra.

Seguimiento de la respuesta farmacológica *in vitro* en muestras del paciente.

45 Para determinar la respuesta del paciente n° 2 al tratamiento farmacológico *in vitro*, se trató una muestra de sangre con diversas cantidades de imatinib o nilotinib y se sometió a ensayo BCR-ABL total y en estado activado. El inmunoensayo CEER era capaz de detectar la respuesta al tratamiento farmacológico en muestras del paciente n° 7, demostrando de esta manera que dicho ensayo es una herramienta útil para determinar la mejor terapia para el paciente.

50 El paciente n° 3 fue diagnosticado con LMC y recibió tratamiento de dasatinib (Sprycel). Se realizó el seguimiento de los niveles de BCR-ABL total y activado en 5 puntos temporales (2/07, 4/04, 7/25, 8/22 y 10/17). La sangre extraída el 2/07 y el 4/04 se procesó utilizando la realización de 96 pocillos del aparato de aislamiento celular y la sangre extraída el 7/25 y el 8/22 se procesó utilizando la realización de tubo del aparato de la presente invención. La FIG. 29A muestra que la proporción pBCR/WBC era mínima en 10/17. La FIG. 29B ilustra que el nivel de fosfo-BCR-ABL con pico en la muestra de 7/25 y se redujo a su nivel mínimo en la muestra del 10/17. El paciente n° 3 respondió al dasatinib y presentaba niveles más bajos de BCR-ABL activado en el punto temporal, tal como se señala en la FIG. 29A. Los resultados del ensayo CEER para fosfo-BCR-ABL se correlacionan con los datos de expresión de ARNm.

60 El paciente n° 8 fue diagnosticado con LMC en julio de 2007 y se le cambió de tratamiento de imatinib a dasatinib el 05/25. Se extrajo sangre el 5/18 y el 6/20 y se procesó utilizando la realización de 96 pocillos del aparato de aislamiento celular de la presente invención. La realización de tubo de la presente invención se utilizó para aislar y lisar leucocitos y CTC de sangre extraída el 7/18, 8/18 y 10/13. La FIG. 30A muestra que la proporción de fosfo-BCR-ABL/WBC se redujo entre 5/18 y 8/18, aunque se había incrementado el 03/13. La proporción de fosfo-BCR-ABL/BCR-ABL total se incrementó mientras el paciente recibía dasatinib (FIG. 30B), posiblemente debido a la progresión de la LMC.

65

5 El paciente nº 18 respondió a un tratamiento inicial de nilotinib el 08/20 y después a un tratamiento de ponatinib el 08/22. Toda la sangre extraída del paciente en el presente estudio se procesó utilizando la realización de tubo del aparato de aislamiento celular de la presente invención. Los resultados de los métodos de la presente invención demuestran que la proporción pBCR-ABL/WBC se redujo durante el curso de la terapia. La proporción de ARNm determinada mediante métodos estándares conocidos por el experto en la materia también muestra una reducción de BCR-ABL durante el periodo de tiempo medido.

10 El paciente nº 14 fue diagnosticado con LMC en junio y recibió tratamiento de hidroxiurea el 6/28 y dasatinib el 08/29. La sangre extraída el 8/29 y el 10/03 se procesó utilizando la realización de tubo del aparato de aislamiento celular de la presente invención. La FIG. 31B muestra que el nivel de fosfo-BCR-ABL activado (proporción pBCR-ABL/WBC) se redujo después del primer punto temporal (6/28) y se encontraba en su mínimo en el último punto temporal (20 de octubre). Una muestra de sangre del paciente nº 14 se trató *in vitro* con diferentes concentraciones de imatinib o nilotinib. La FIG. 32A-B muestra que la respuesta *in vitro* del paciente nº 14 al tratamiento farmacológico conduce a una reducción del nivel de BCR-ABL fosforilado con el tratamiento de imatinib o de nilotinib.

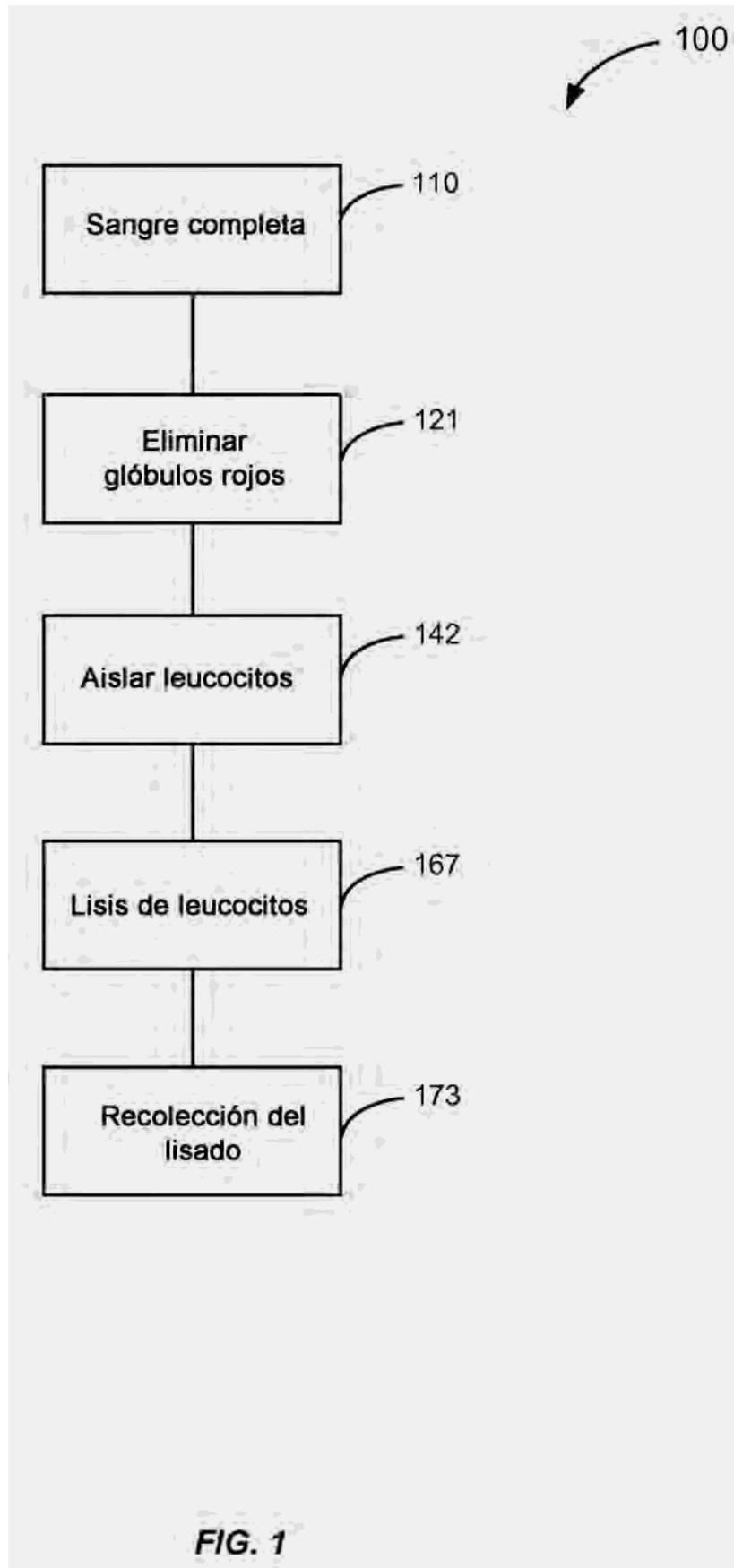
15 Conclusión

20 El presente ejemplo ilustra el análisis de la expresión y fosforilación de BCR-ABL en lisados celulares obtenidos de 20 pacientes de LMC. El presente ejemplo ilustra la utilización de métodos de la presente invención, incluyendo el método de aislamiento celular y el inmunoensayo CEER. En particular, se aislaron glóbulos blancos y células tumorales circulantes a partir de una muestra de sangre completa del paciente sin eliminar o diluir el nivel de fármaco en la sangre. Se observaron diferentes niveles de inhibición de quinasa de BCR-ABL en los pacientes que recibían tratamiento específico. El presente ejemplo demuestra además que la detección de BCR-ABL mediante el inmunoensayo CEER presenta un nivel elevado de sensibilidad funcional y resulta de utilidad clínica para el seguimiento de la progresión de la LMC. Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para el cribado y el seguimiento de la eficacia del fármaco que resulta muy beneficiosa para los pacientes de LMC que reciben terapia específica. De manera similar, los métodos pueden ayudar al médico a determinar las opciones de tratamiento más eficaces para el paciente.

30

REIVINDICACIONES

1. Aparato para aislar y separar leucocitos de glóbulos rojos en una muestra de sangre completa, que comprende: un dispositivo de filtración que comprende una cámara superior (410), que es un tubo cilíndrico, una cámara inferior (420), que es un tubo cilíndrico y una o más membranas de filtración apiladas (412) entre dichas cámaras superior e inferior, en el que dichas membranas de filtración apiladas son capaces de retener dichos leucocitos, en el que los diámetros internos de las cámaras superior e inferior son similares de manera que generan un tubo cilíndrico que permite el paso de líquidos a su través, y
- 5 un tubo de recolección (435) para recolectar glóbulos rojos a partir de dicha muestra de sangre completa, en el que dicho dispositivo de filtración se sitúa en la parte superior de dicho tubo de recolección, y en el que dichos glóbulos rojos se separan de dichos leucocitos y se recolectan en dicho tubo de recolección tras la centrifugación y caracterizado por que dicha o dichas membranas de filtración apiladas se sitúan entre las roscas helicoidales de las cámaras superior e inferior, las cuales se fijan firmemente entre sí.
- 10 2. Aparato según la reivindicación 1, en el que dicho dispositivo de filtración comprende dos, tres o cuatro membranas de filtración apiladas (412).
- 15 3. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha cámara superior comprende además una tapa de ajuste a presión (215) unida a la misma.
- 20 4. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichos leucocitos se seleccionan de entre el grupo que consiste de leucocitos normales, leucocitos malignos, leucocitos enfermos y combinaciones de los mismos.
- 25 5. Aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho aparato es una pluralidad de dispositivos de filtración.
- 30 6. Método para preparar un lisado de leucocitos a partir de una muestra de sangre completa sin dilución de un agente terapéutico, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
 - (a) carga de dicha muestra de sangre completa en un aparato según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
 - (b) centrifugación de dicho aparato para capturar dichos leucocitos sobre la membrana o membranas de filtración apiladas y para separar los glóbulos rojos en dicho tubo de recolección, y
 - (c) lisado de dichos leucocitos capturados sobre la membrana o membranas de filtración apiladas con tampón de lisis aunque sin una etapa de lavado entre las etapas (b) y (c) para preparar de esta manera un lisado de leucocitos.
- 35 7. Método según la reivindicación 6, que comprende además sustituir dicho tubo de recolección por un segundo tubo de recolección entre las etapas (b) y (c).
- 40 8. Método según la reivindicación 7, que comprende además centrifugar dicho aparato que contiene dicho segundo tubo de recolección tras lisar dichos leucocitos en la etapa (c) y recolectar dicho lisado de leucocitos en dicho segundo tubo de recolección.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicha muestra de sangre completa se incuba *in vitro* con un agente terapéutico antes de la carga en dicho aparato.
- 50 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que se mide el nivel de expresión y/o activación de por lo menos una proteína de fusión oncogénica y/o molécula de transducción de señales en dicho lisado de leucocitos.
- 55 11. Método según la reivindicación 10, en el que la proteína o proteínas de fusión oncogénicas comprenden BCR-ABL.
- 60 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho aparato es una pluralidad de dispositivos de filtración.
- 65 13. Aparato según la reivindicación 1, en el que dicha cámara superior es un tubo cilíndrico con estrías helicoidales macho o rosca (210).
14. Aparato según la reivindicación 3, en el que la tapa de ajuste a presión se fija mediante una tira (217) a la cámara superior.
15. Aparato según la reivindicación 13, en el que la rosca de la parte superior encaja firmemente en las estrías hembra (221) de la cámara inferior.
16. Aparato según la reivindicación 1, un dispositivo de filtración en el que la cámara superior y la cámara inferior se fijan entre sí mediante roscado.



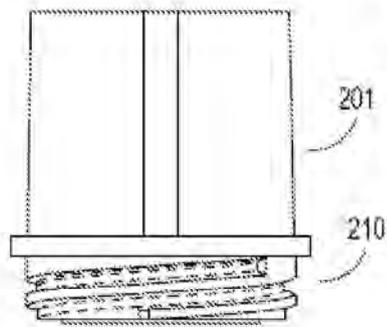


FIG. 2A

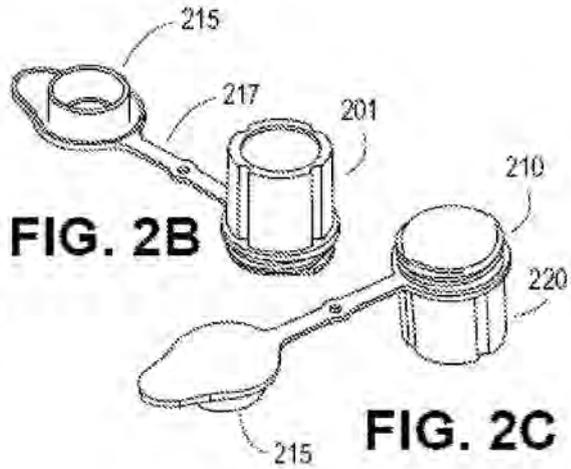


FIG. 2B

FIG. 2C

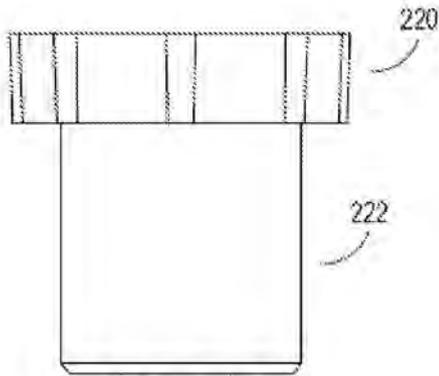


FIG. 2D

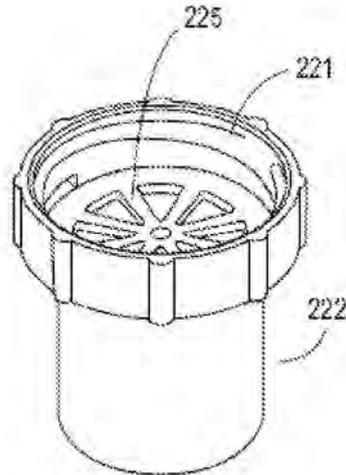


FIG. 2E

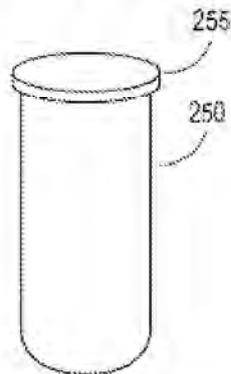


FIG. 2F

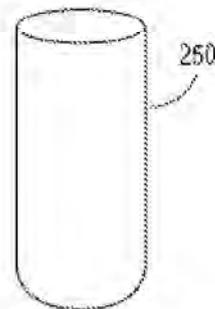


FIG. 2G

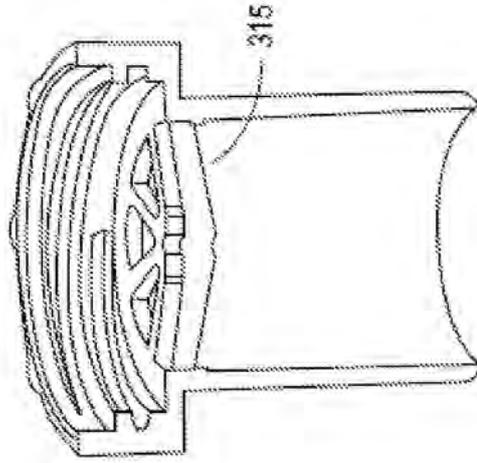


FIG. 3A

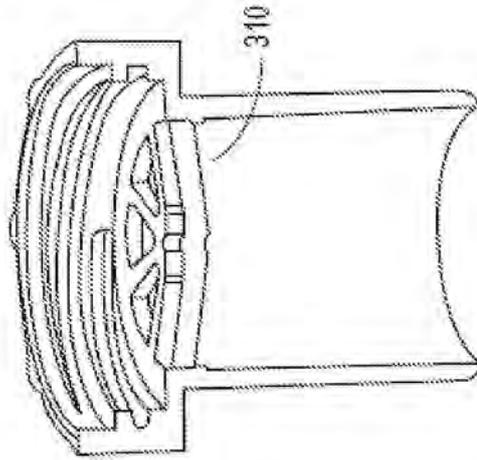


FIG. 3B

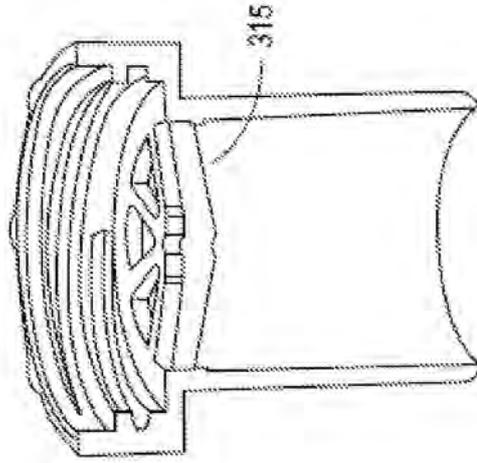


FIG. 3C

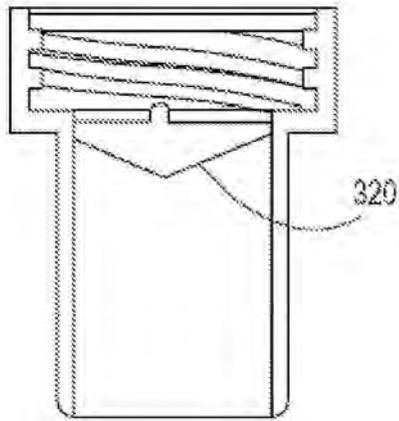


FIG. 3D

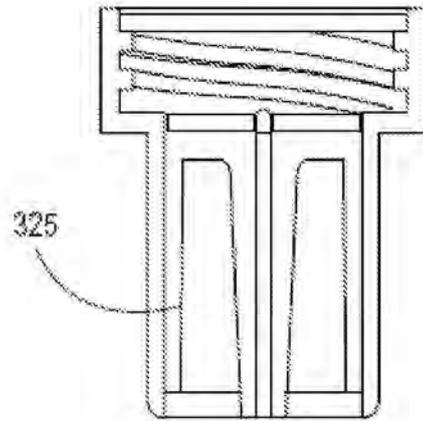


FIG. 3F

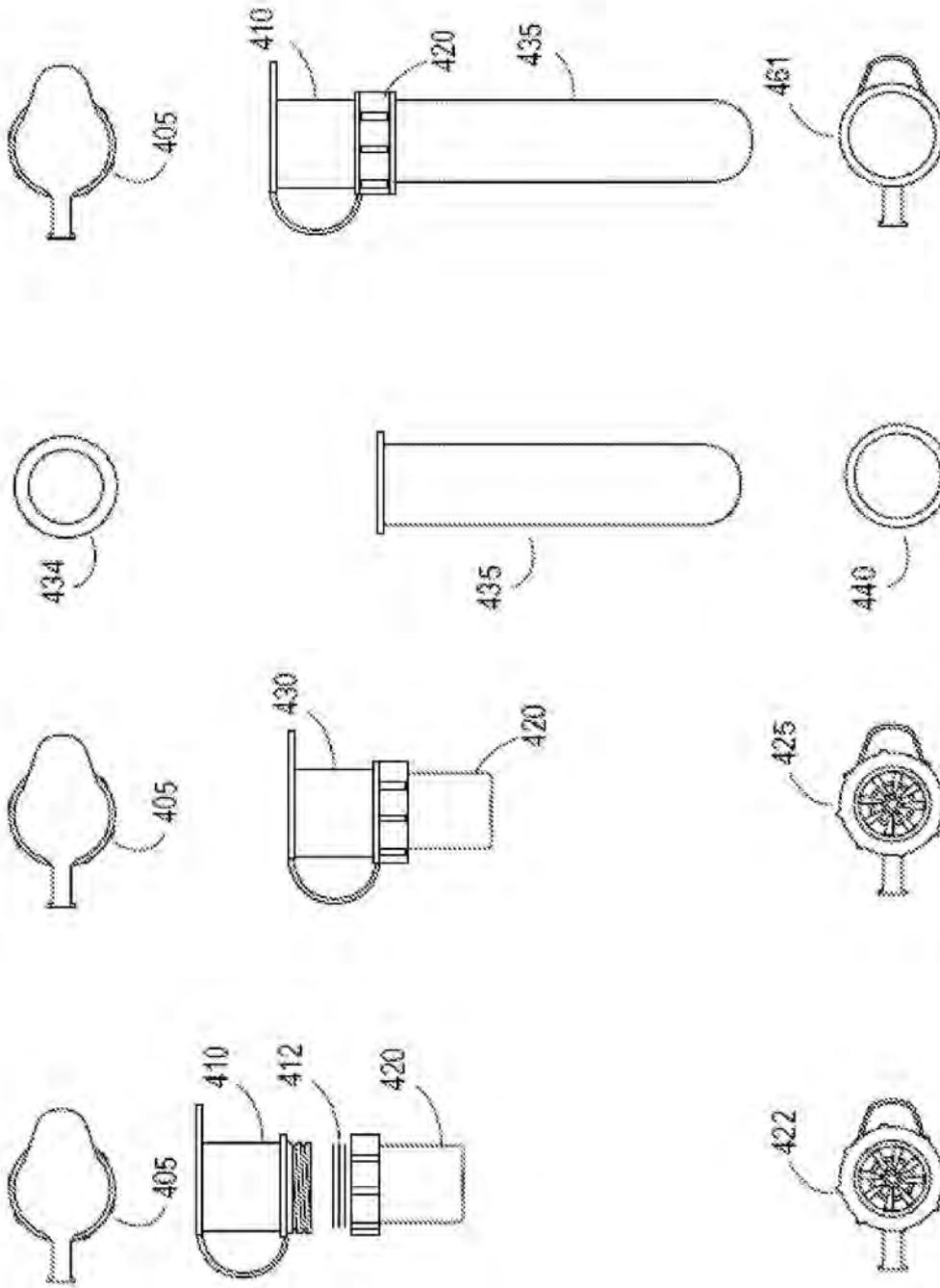


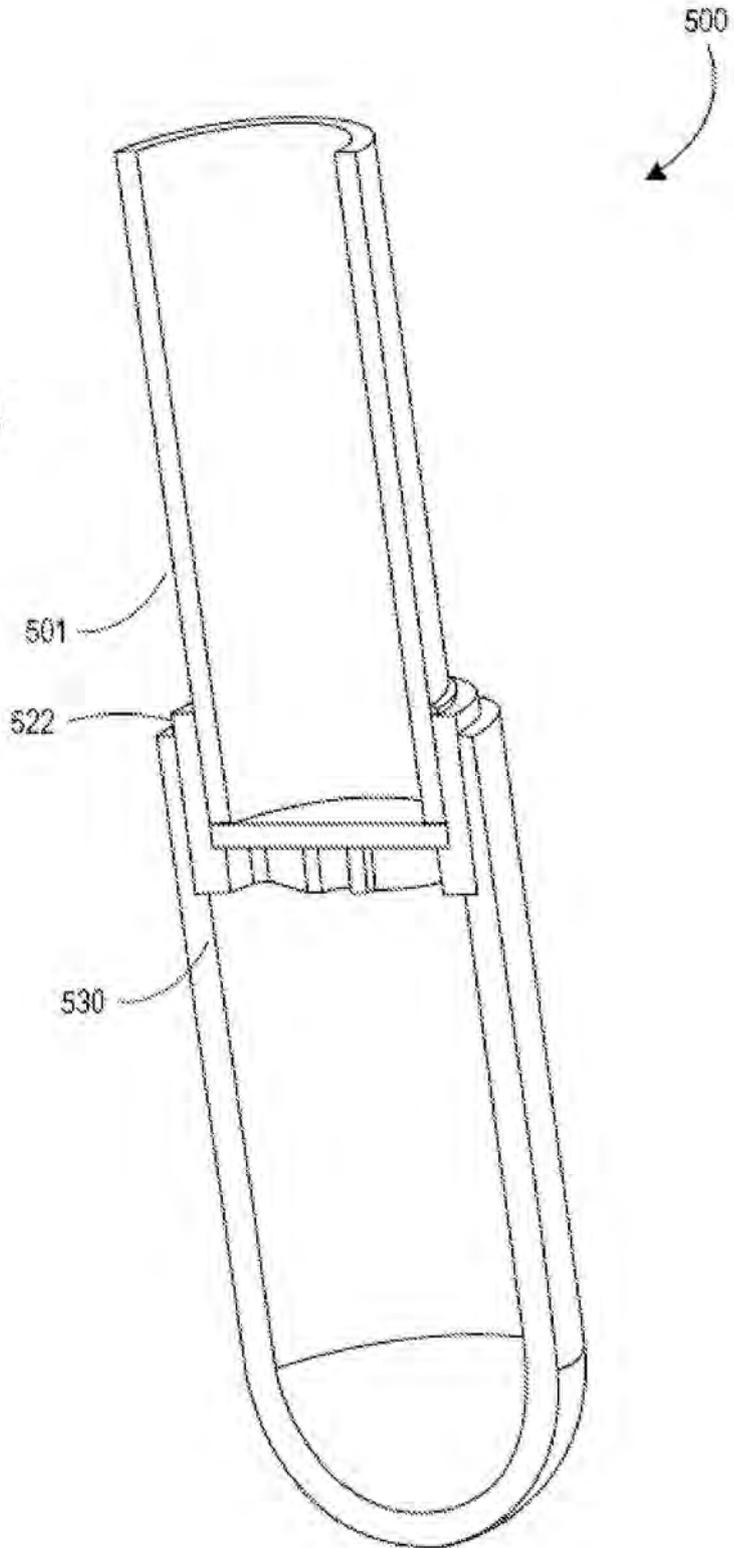
FIG. 4D

FIG. 4C

FIG. 4B

FIG. 4A

FIG. 5A



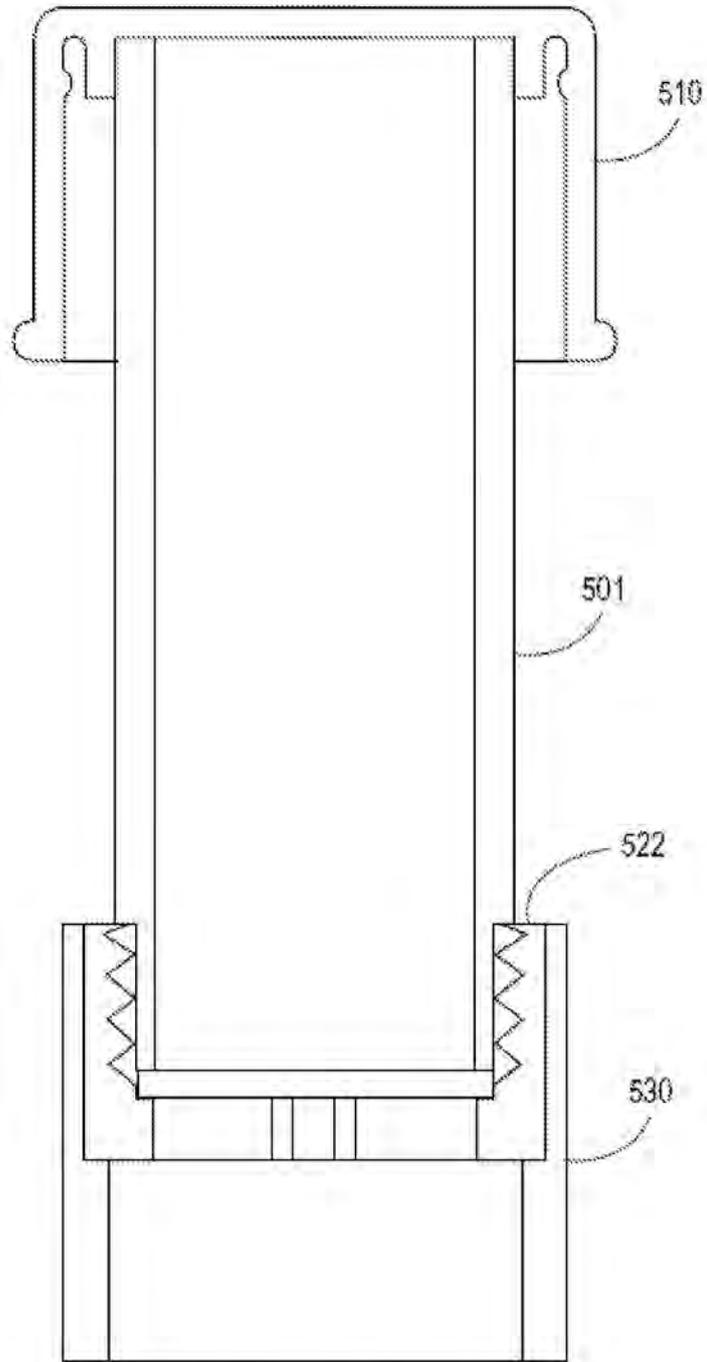


FIG. 5B

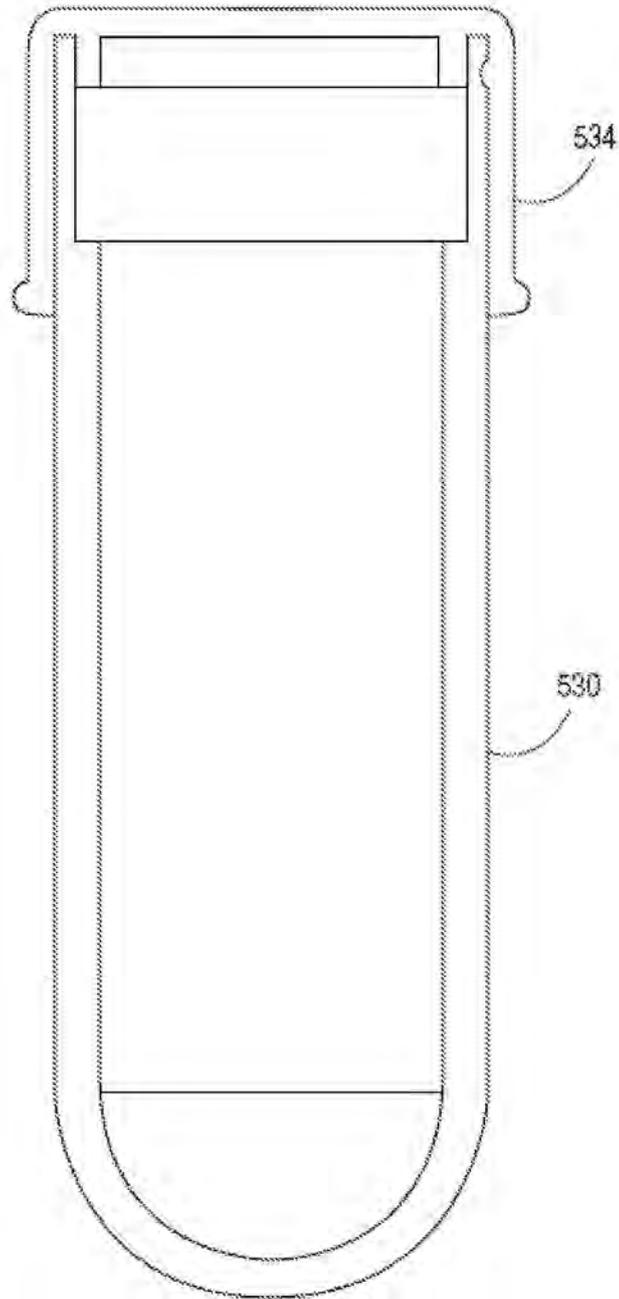


FIG. 5C

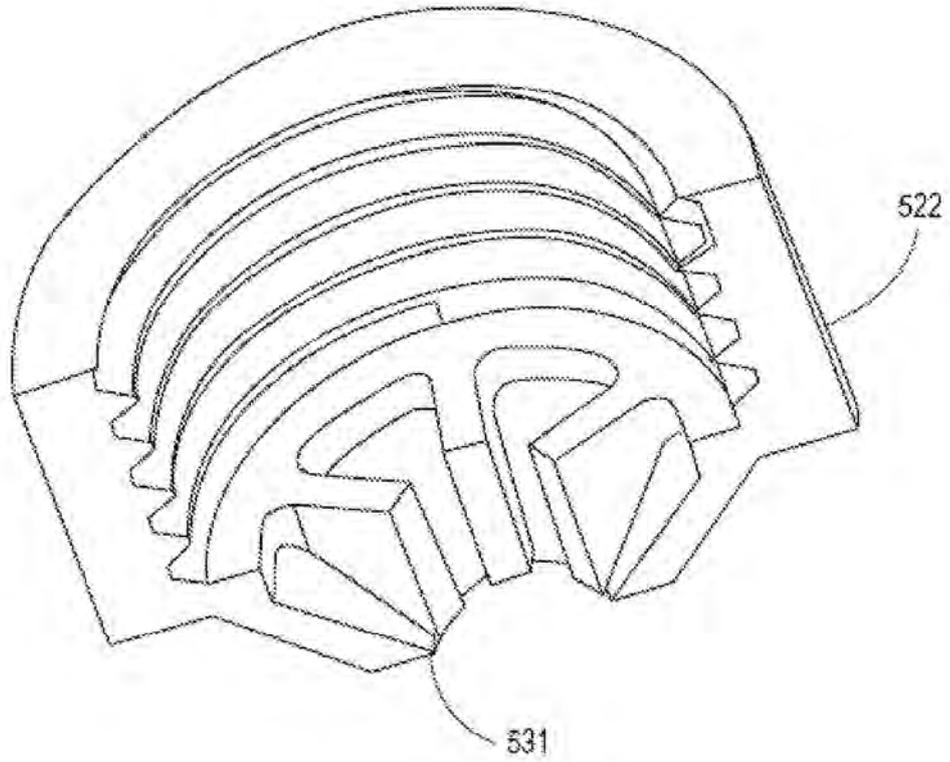
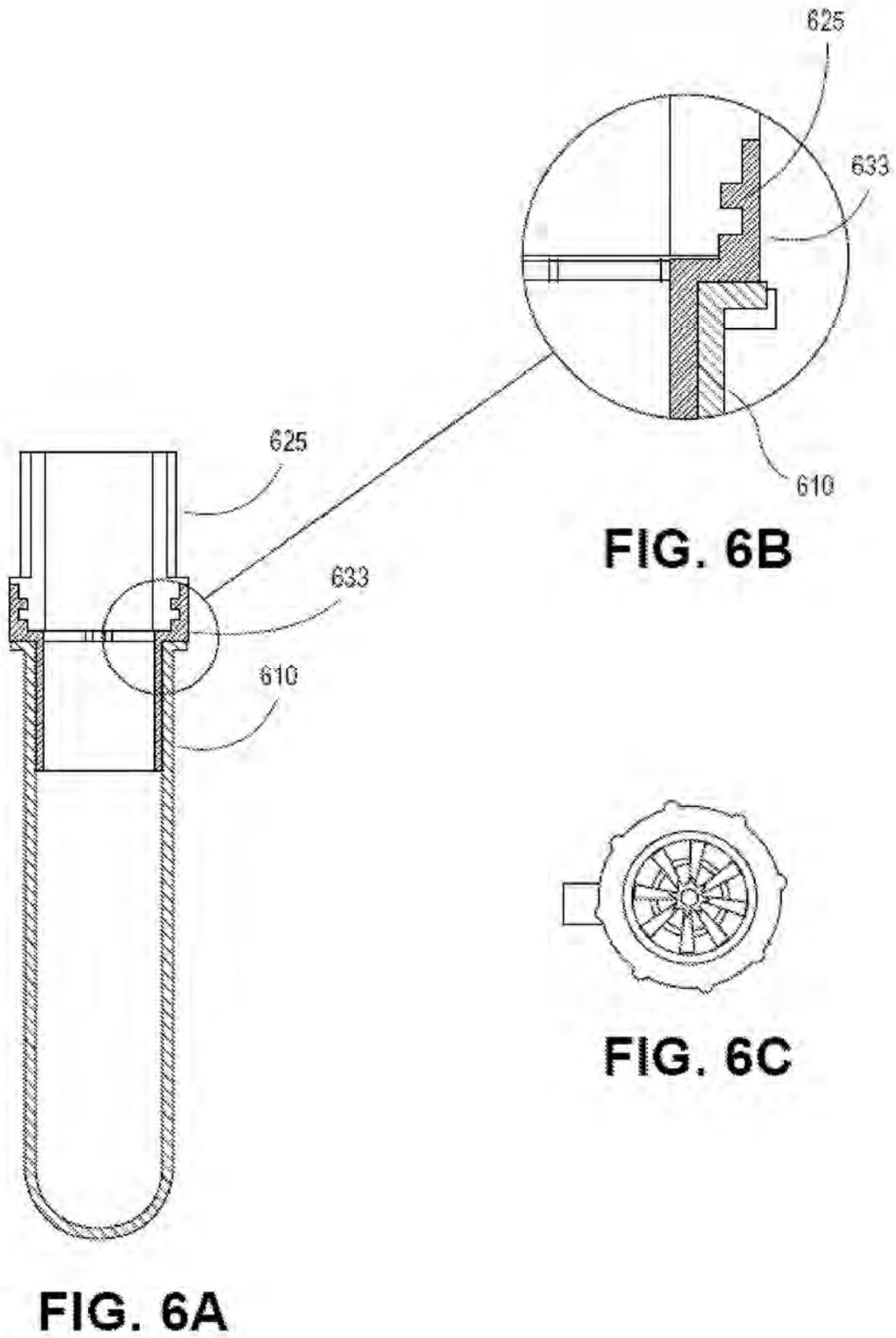


FIG. 5D



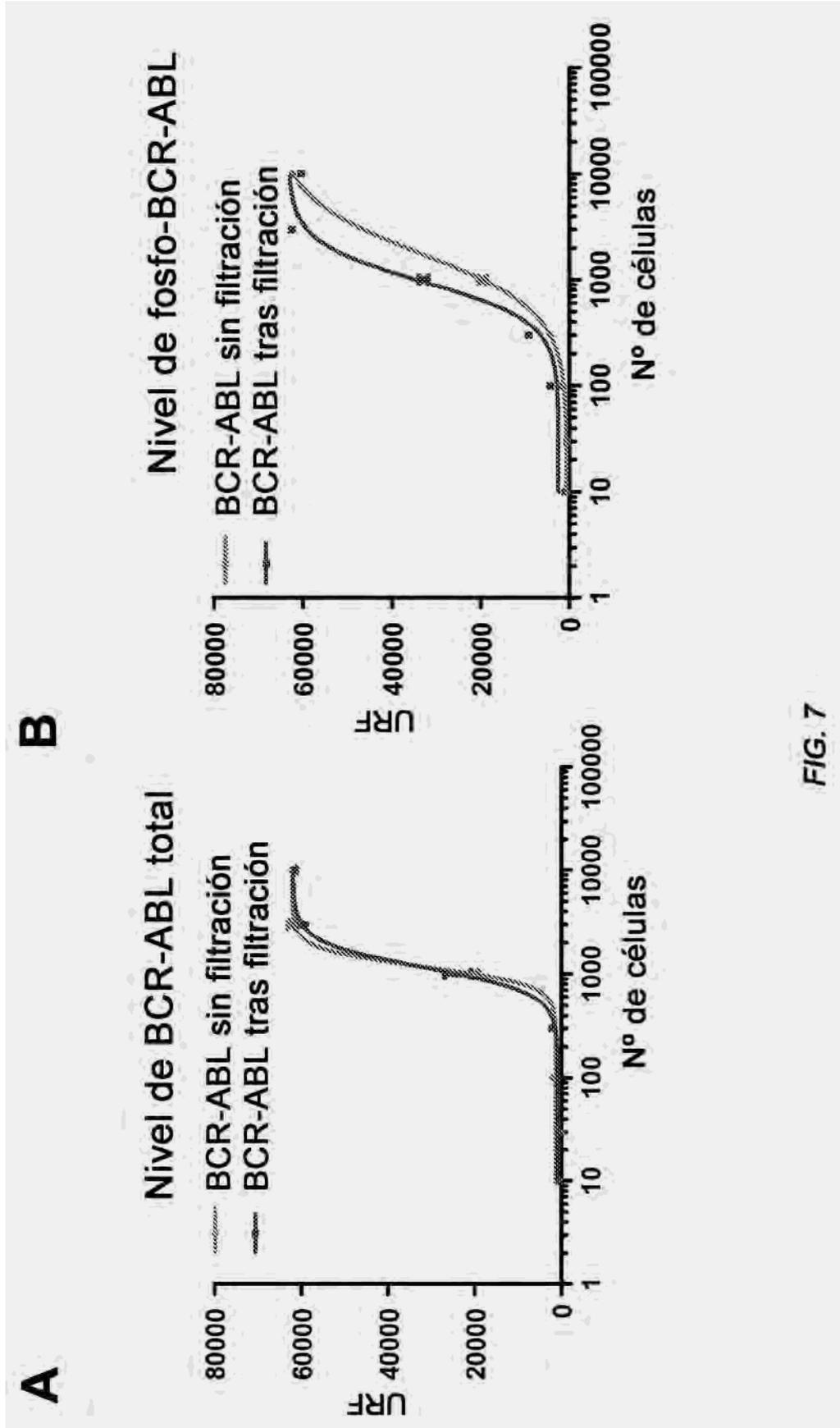
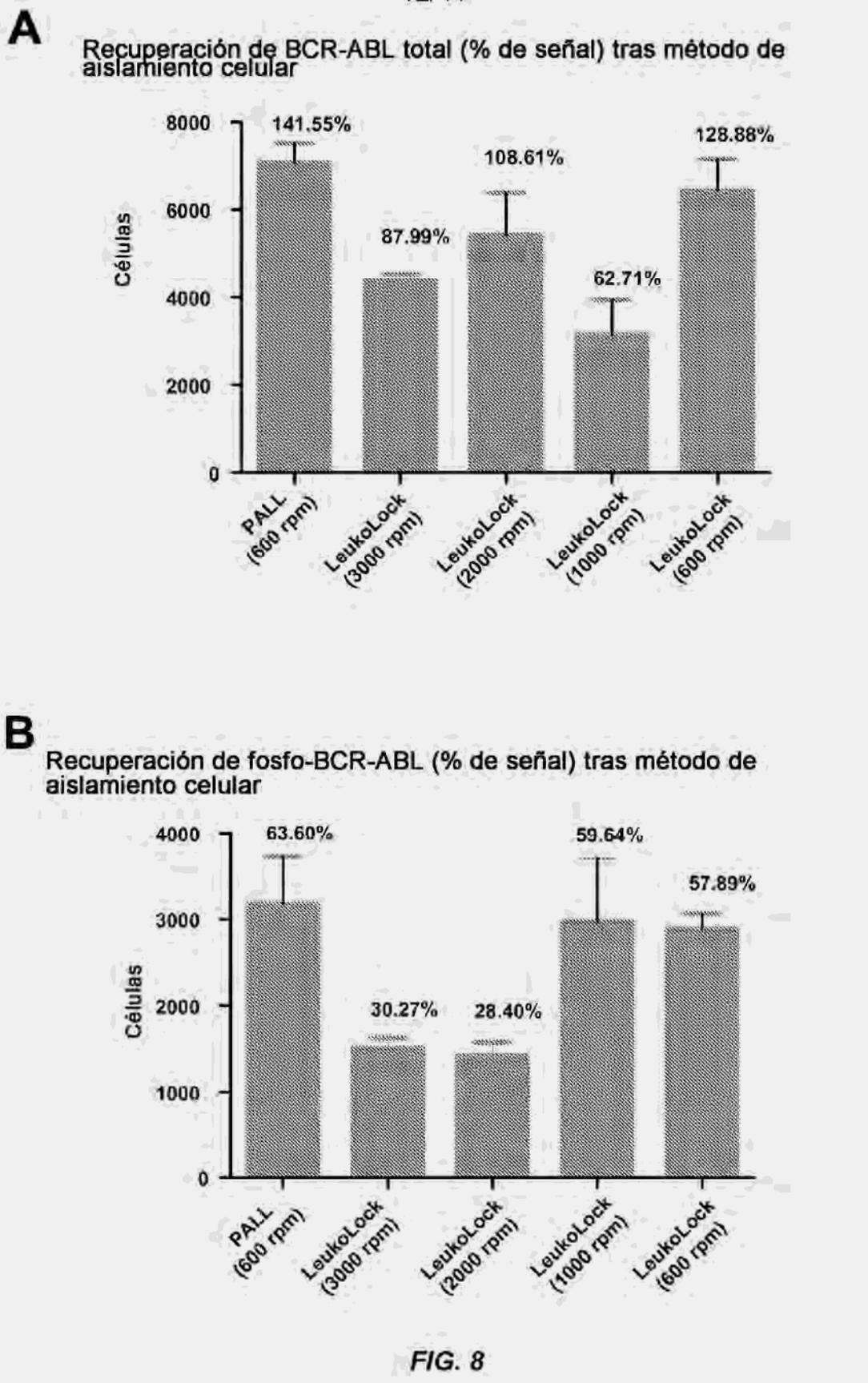
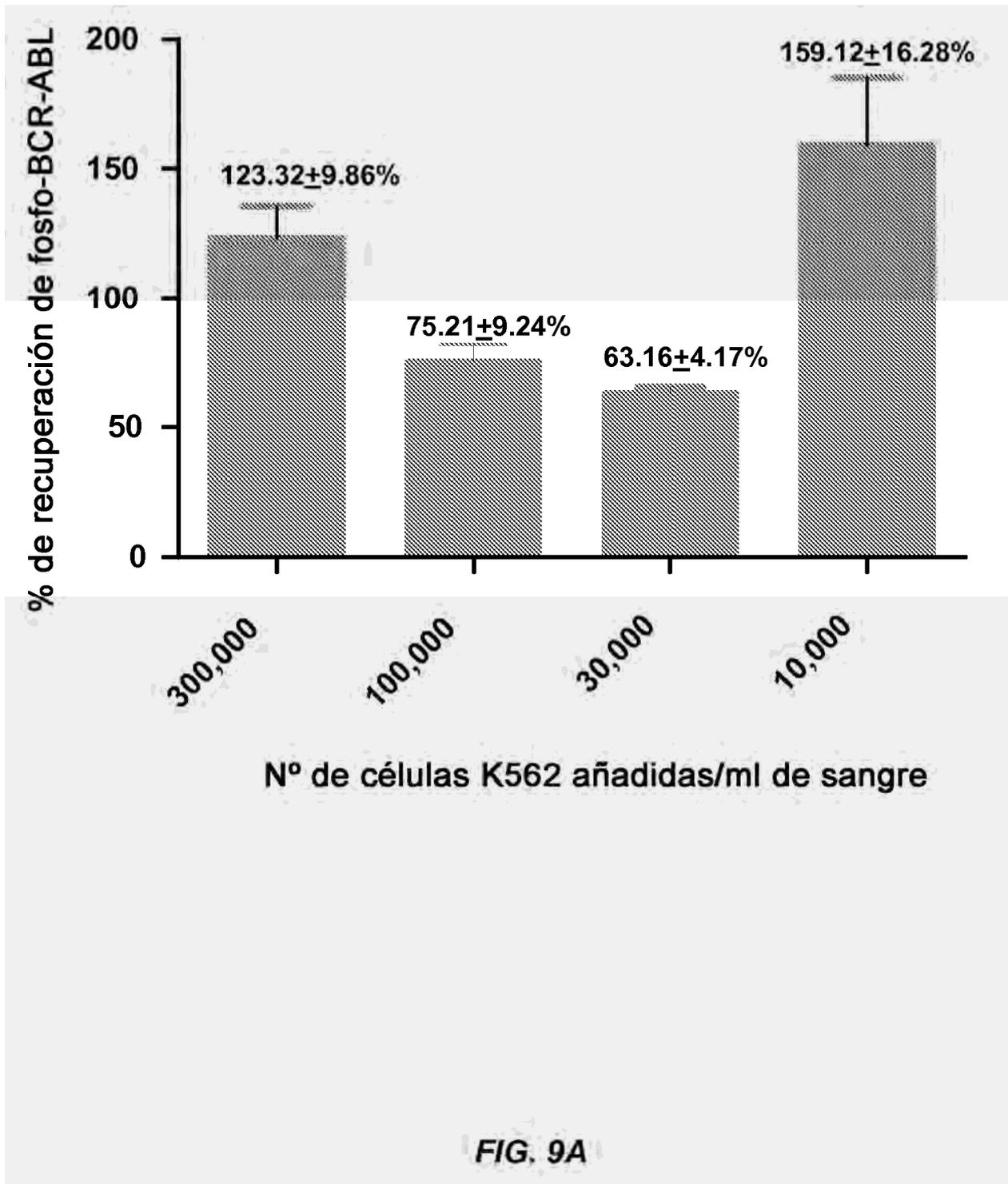
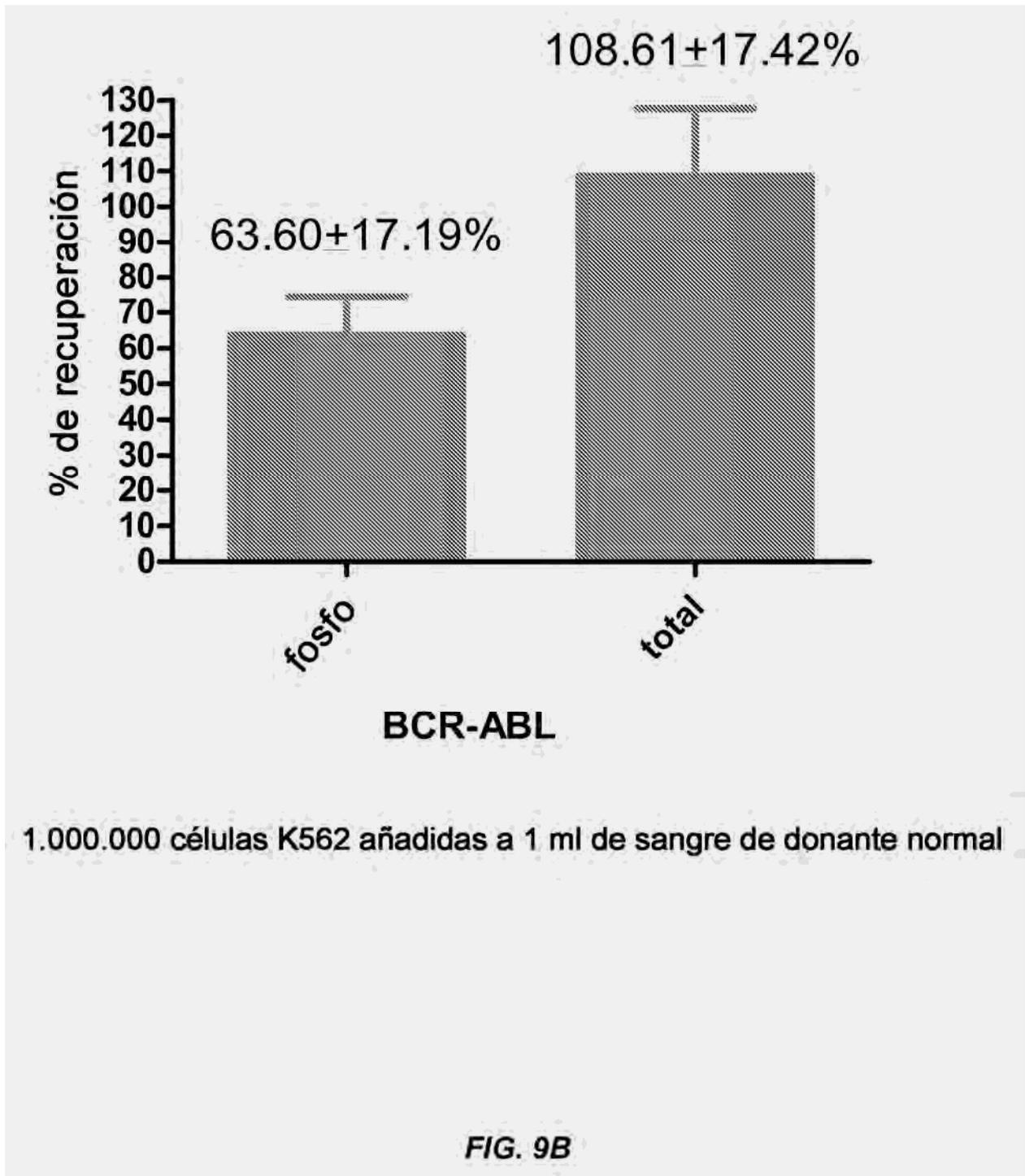


FIG. 7

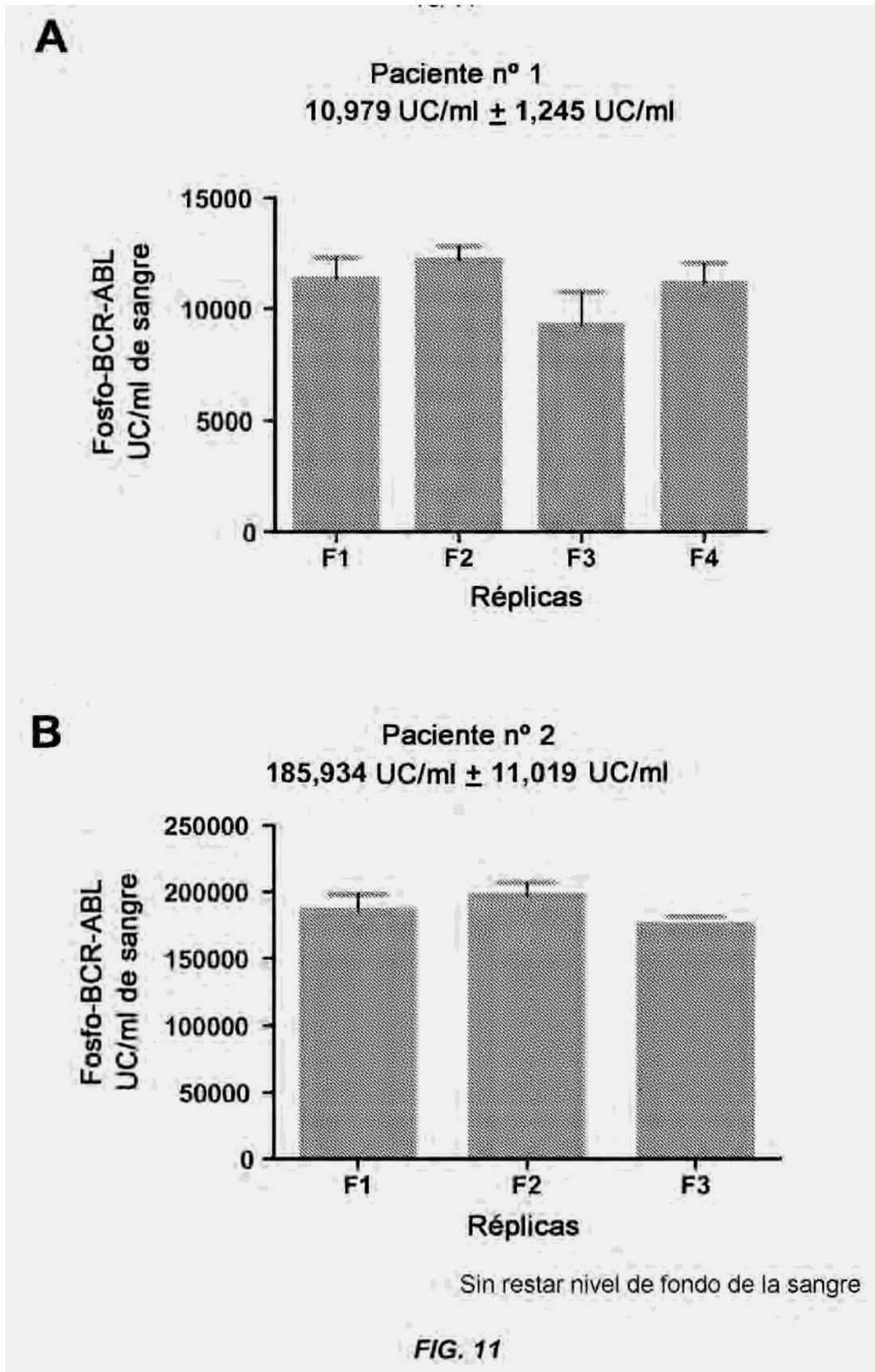




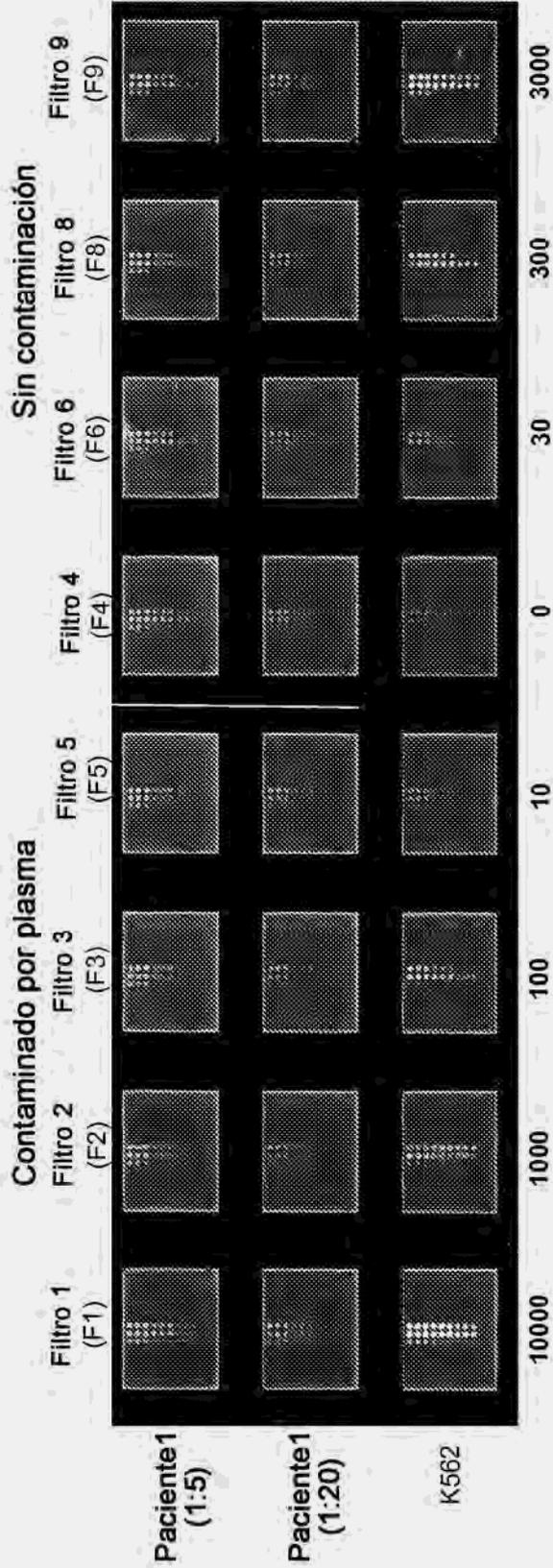


ID de paciente	1	2		
Género	Femenino	Masculino	Masculino	Masculino
Raza	Blanca	Blanca	Blanca	Blanca
Historia de tabaquismo	Actual. Cigarrillos	Actual. Cigarrillos	Actual. Cigarrillos	Uso anteriormente
Historia de alcohol	Sin historia	Sin historia	Sin historia	Uso actualmente
Diagnóstico primario	LMC	LMC	LMC	LMC
Estado de tratamiento	Activo	Activo	Activo	Activo
Tratamiento	imatinib	imatinib	dasatinib	imatinib
Fecha de recolección	1/31	2/2	2/7	2/15
WBC: recuento total de células	5,600,000	15,000,000	4,000,000	-----
WBC: fosfo-BCR-ABL	11,000	156,000	-----	-----
Proporción señal fosfo con imatinib	0.0019	0.0124	-----	-----
Premisa: 90% de inhibición	0,019	0.124	-----	-----

FIG. 10



Perfil de fosfo-BCR-ABL



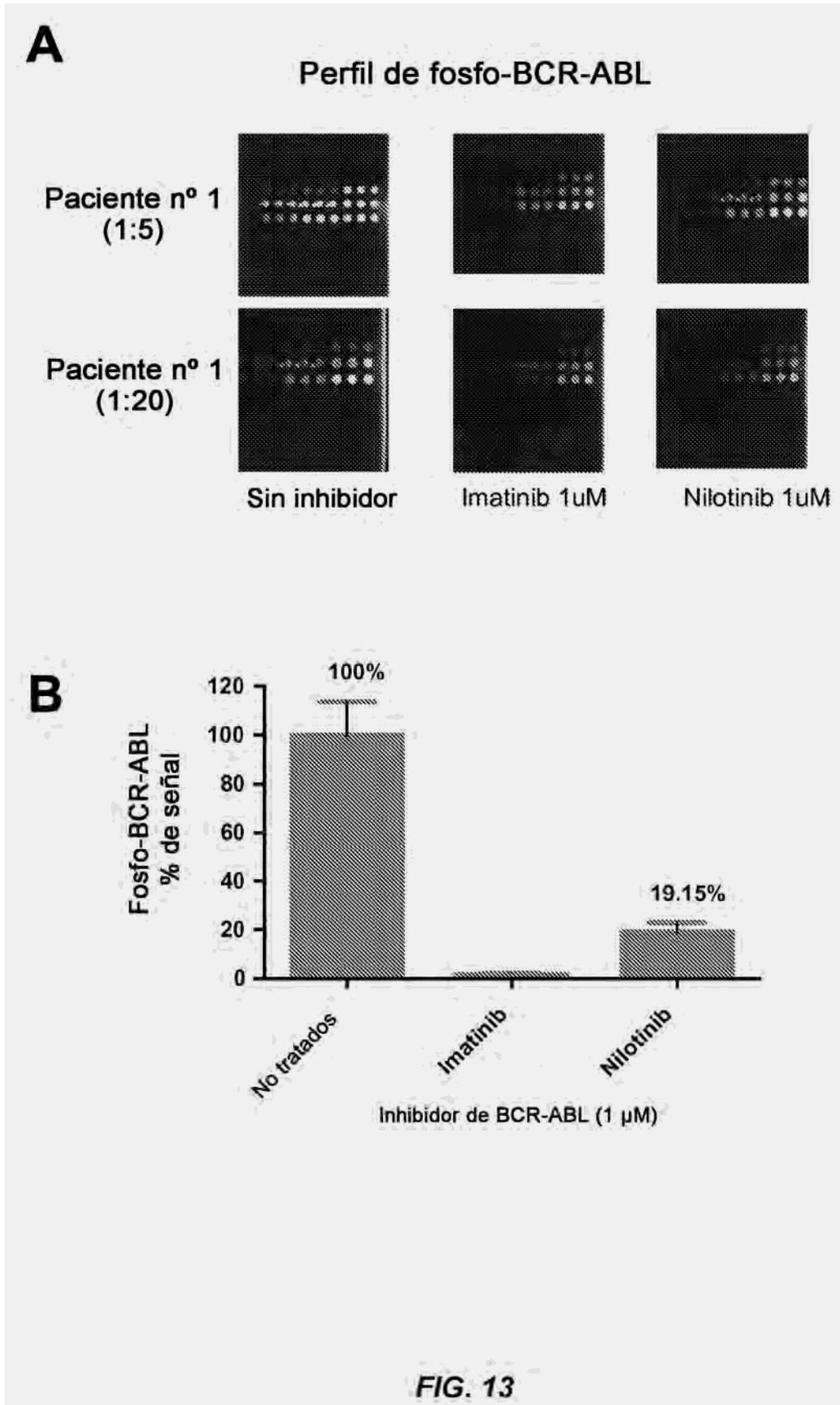
muestra	UC	media	%CV	media	%CV	UC/ml sangre
F1 1:5	206.05	205.53	0.37	144.92	30.62	9,057
F2 1:5	74.39	141.93	-			
F3 1:5	105.16	98.97	22.37			
F5 1:5	120.69	133.40	13.47			
F4 1:5	164.29	181.37	8.51	175.66	11.34	10,979
F6 1:5	190.93	195.38	4.93			
F8 1:5	127.32	148.01	16.13			
F9 1:5	162.00	177.87	8.44			

FIG. 12A

Perfil de fosfo-BCR-ABL del paciente nº 1

Muestra	Media	Razón	Muestra	Media	CV%	Razón	Muestra	Media	CV%	Razón
Standard 10,000	62316	0.18	S1 1:20	2258.7	10.9	2.8	S1 1:5	6381.7	0.7	8.0
1000	60249	1.16	S2 1:20	1146.3	7.9	1.4	S2 1:5	3411.3	15.5	4.3
100	6291.33333	0.81	S3 1:20	1302.0	10.2	1.6	S3 1:5	3457.3	4.7	4.3
10	1519.33333	6.65	S5 1:20	1602.3	3.7	2.0	S5 1:5	3622.0	14.1	4.5
0	801.33333	5.79	S4 1:20	1587.3	4.0	2.0	S4 1:5	5272.7	11.5	6.6
30	2157.66667	12.69	S6 1:20	1538.7	2.2	1.9	S6 1:5	5877.3	8.3	7.3
300	14526.3333	12.84	S8 1:20	1509.3	7.1	1.9	S8 1:5	4245.3	14.7	5.3
3000	62260.6667	0.07	S9 1:20	1885.0	3.4	2.4	S9 1:5	5130.3	11.2	6.4

FIG. 12B



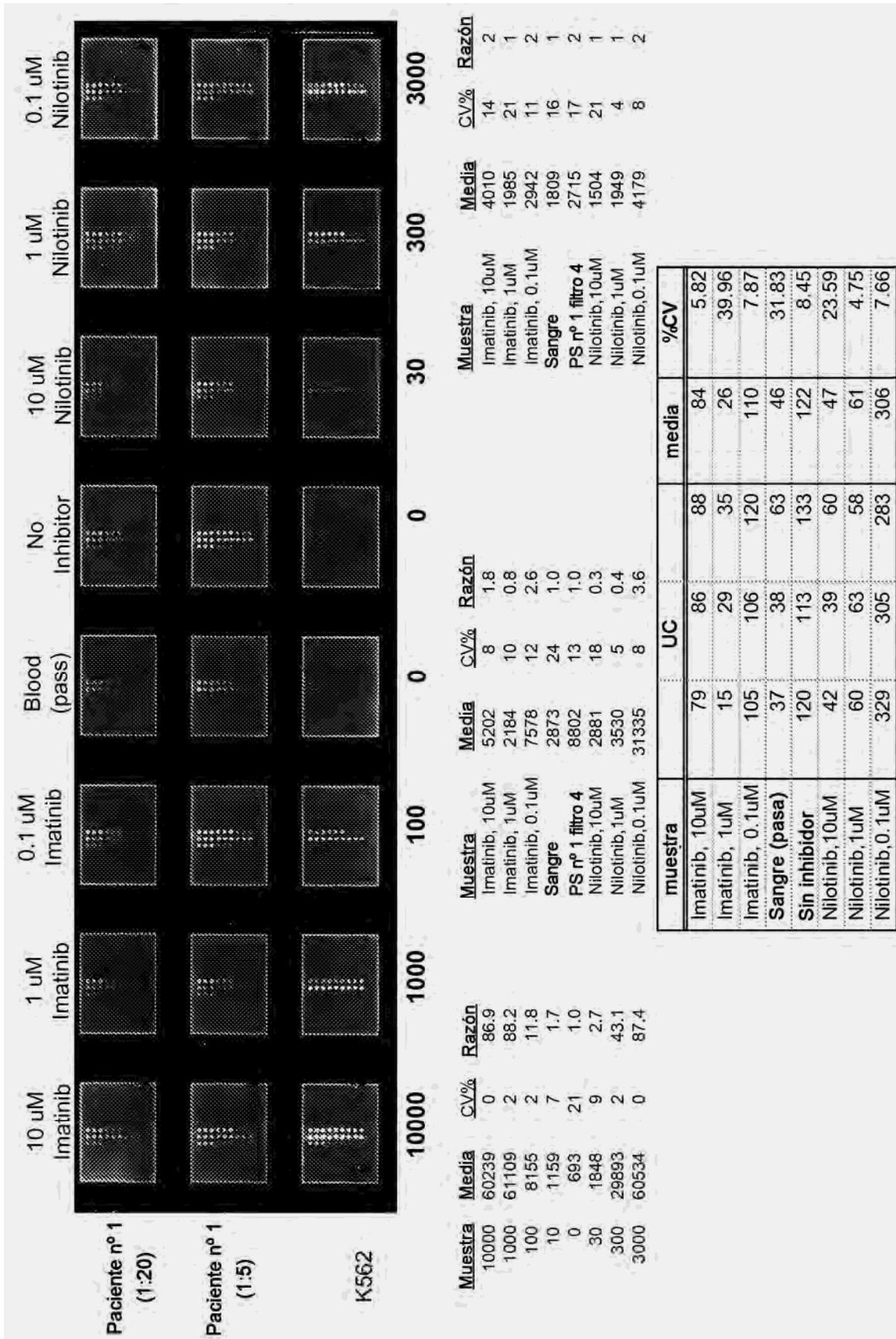
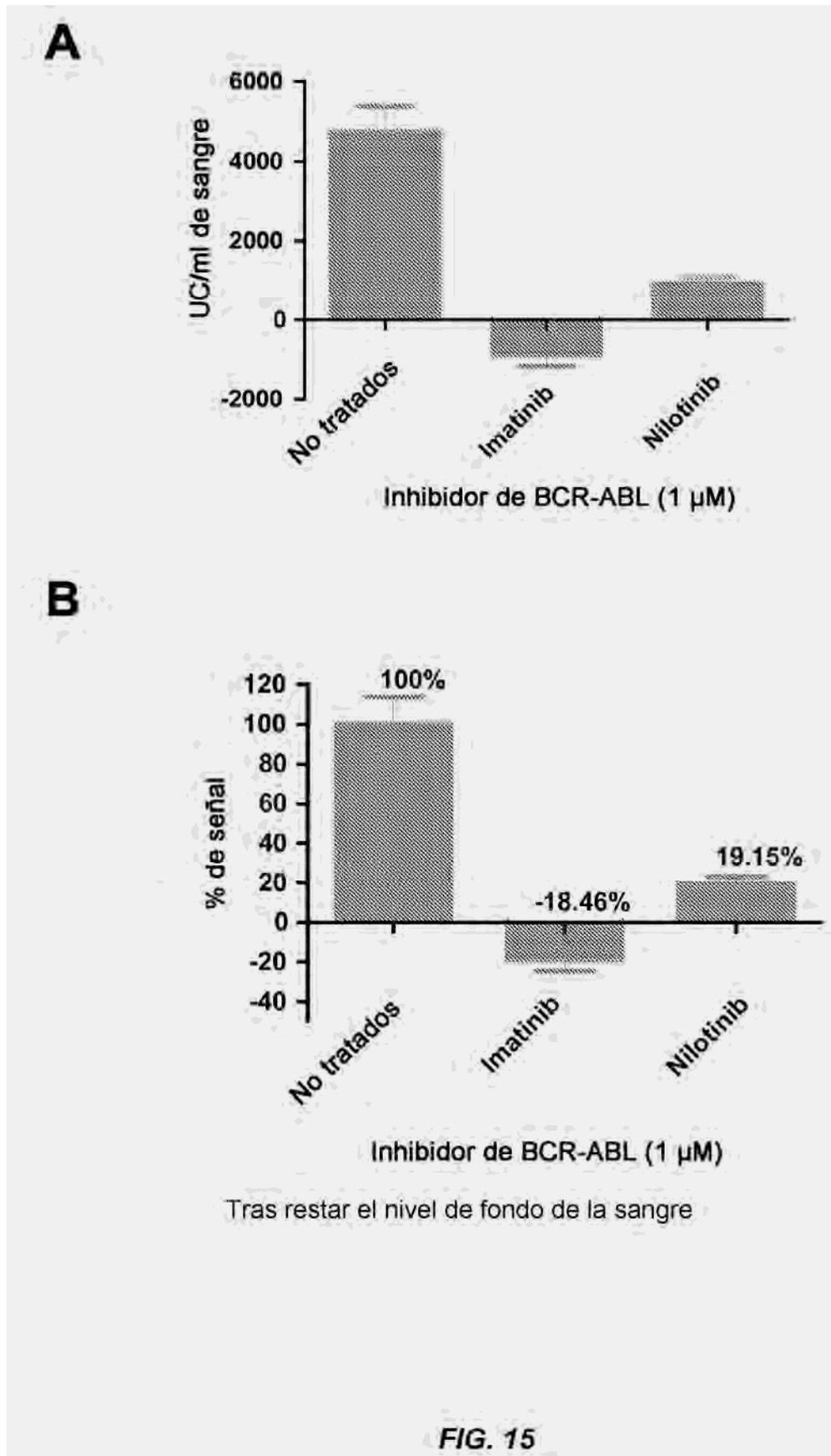
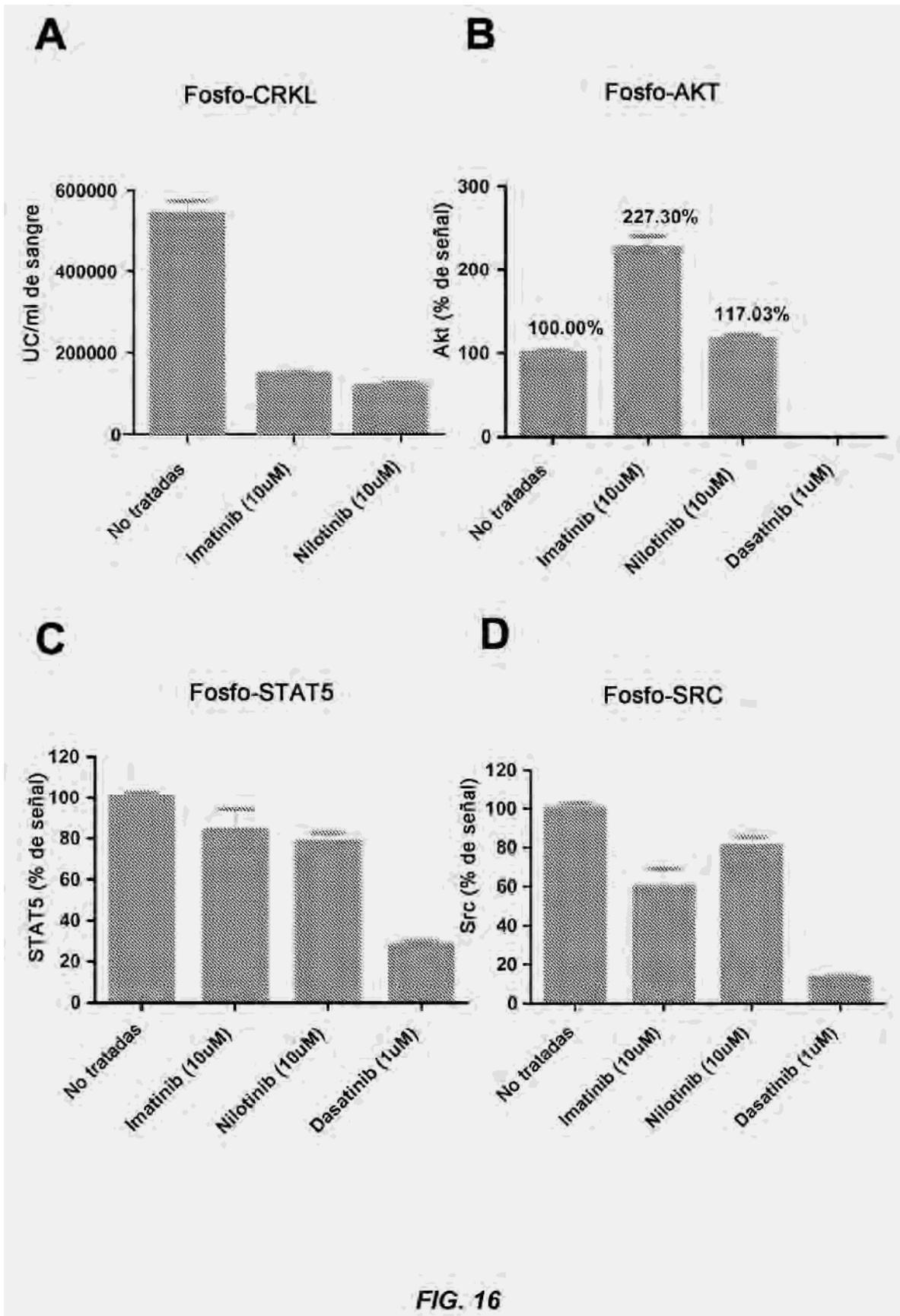


FIG. 14





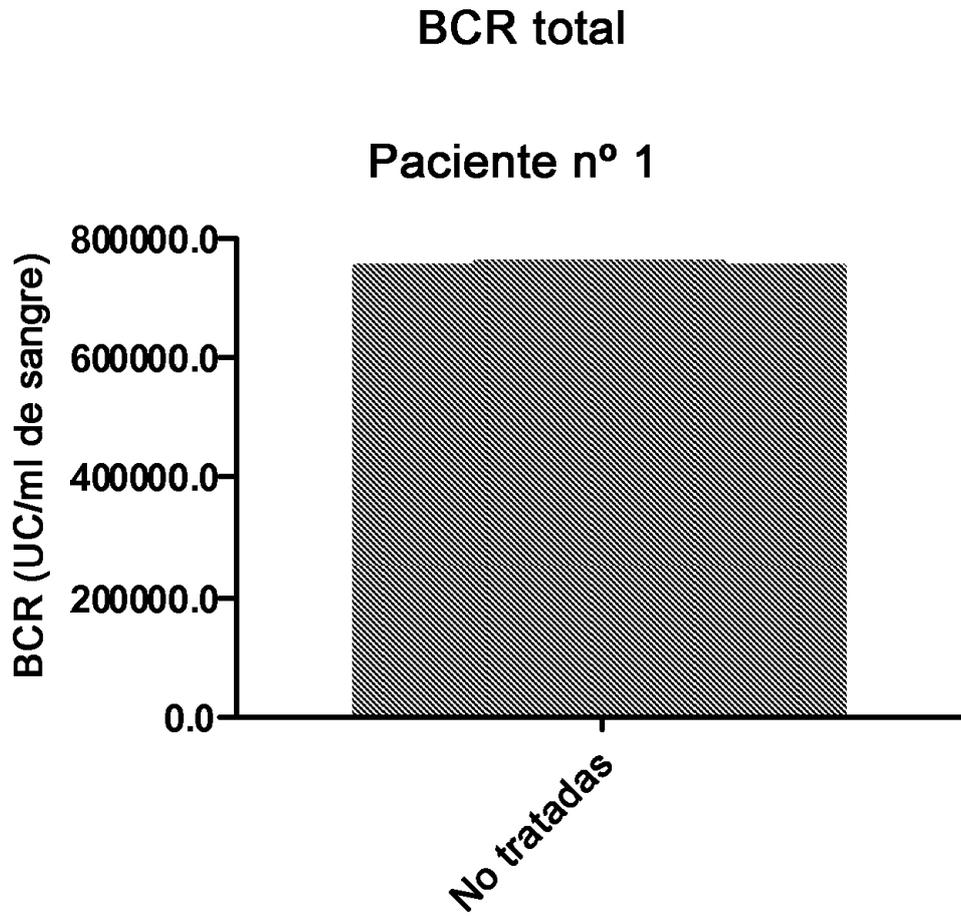


FIG. 17

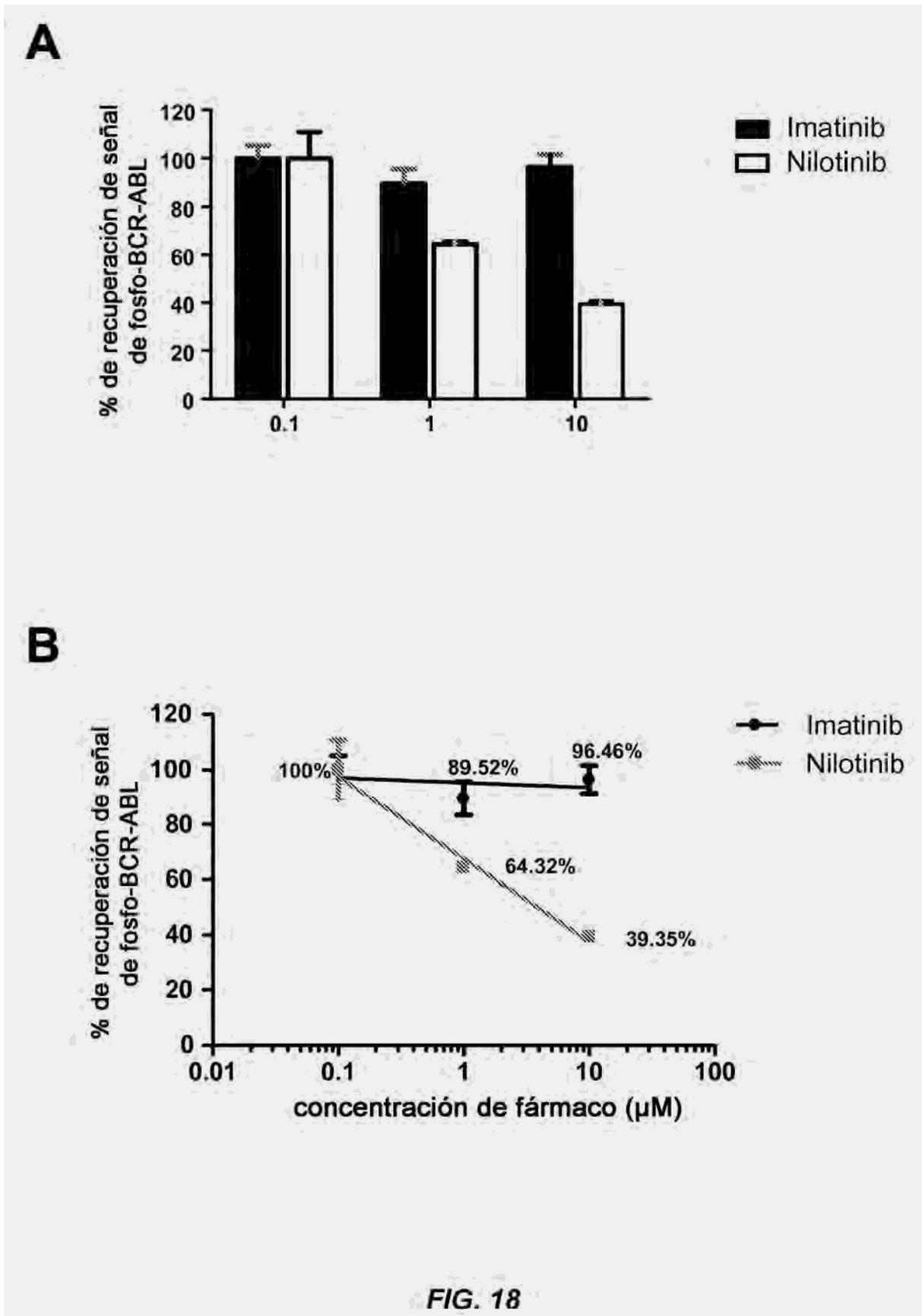
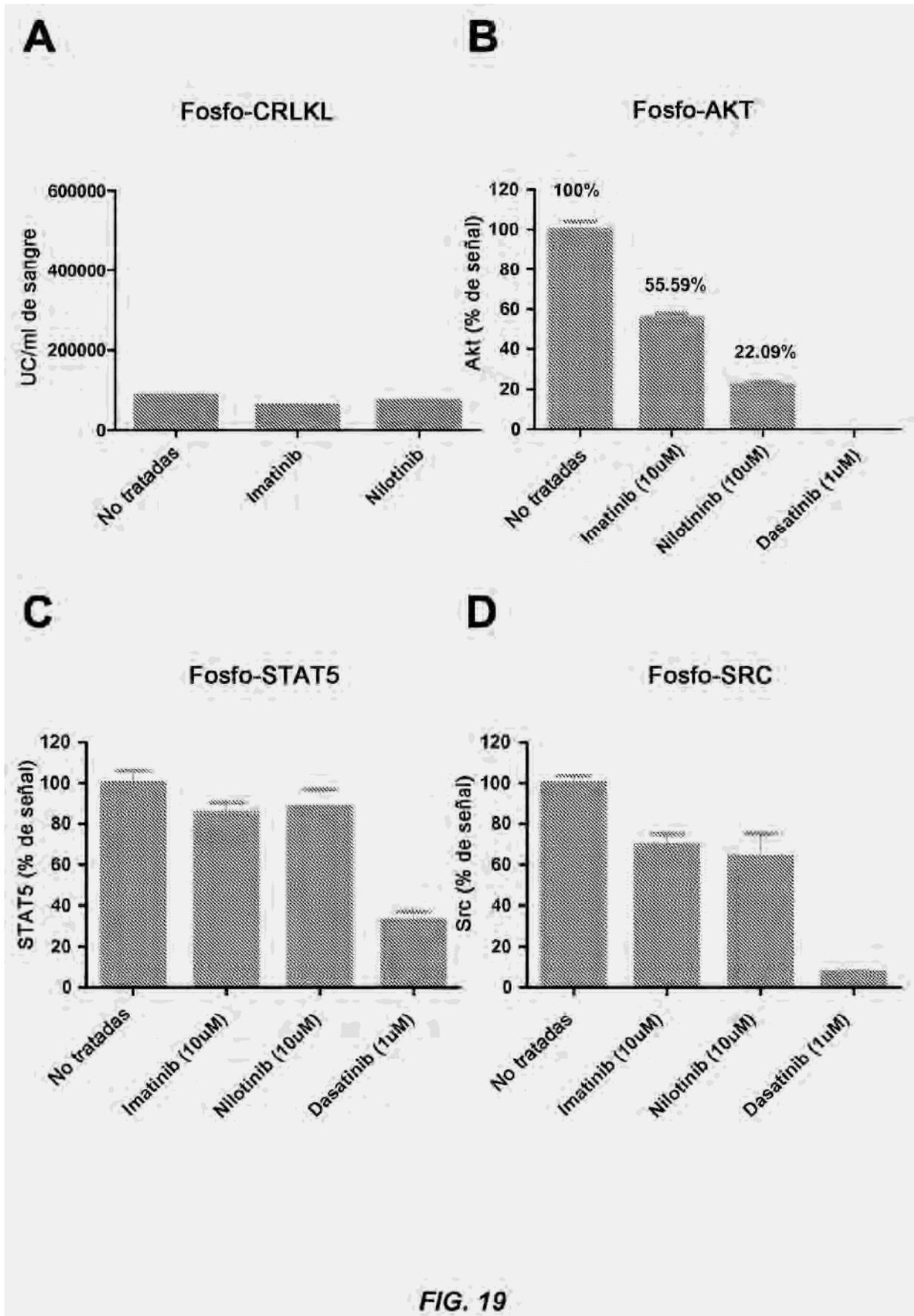
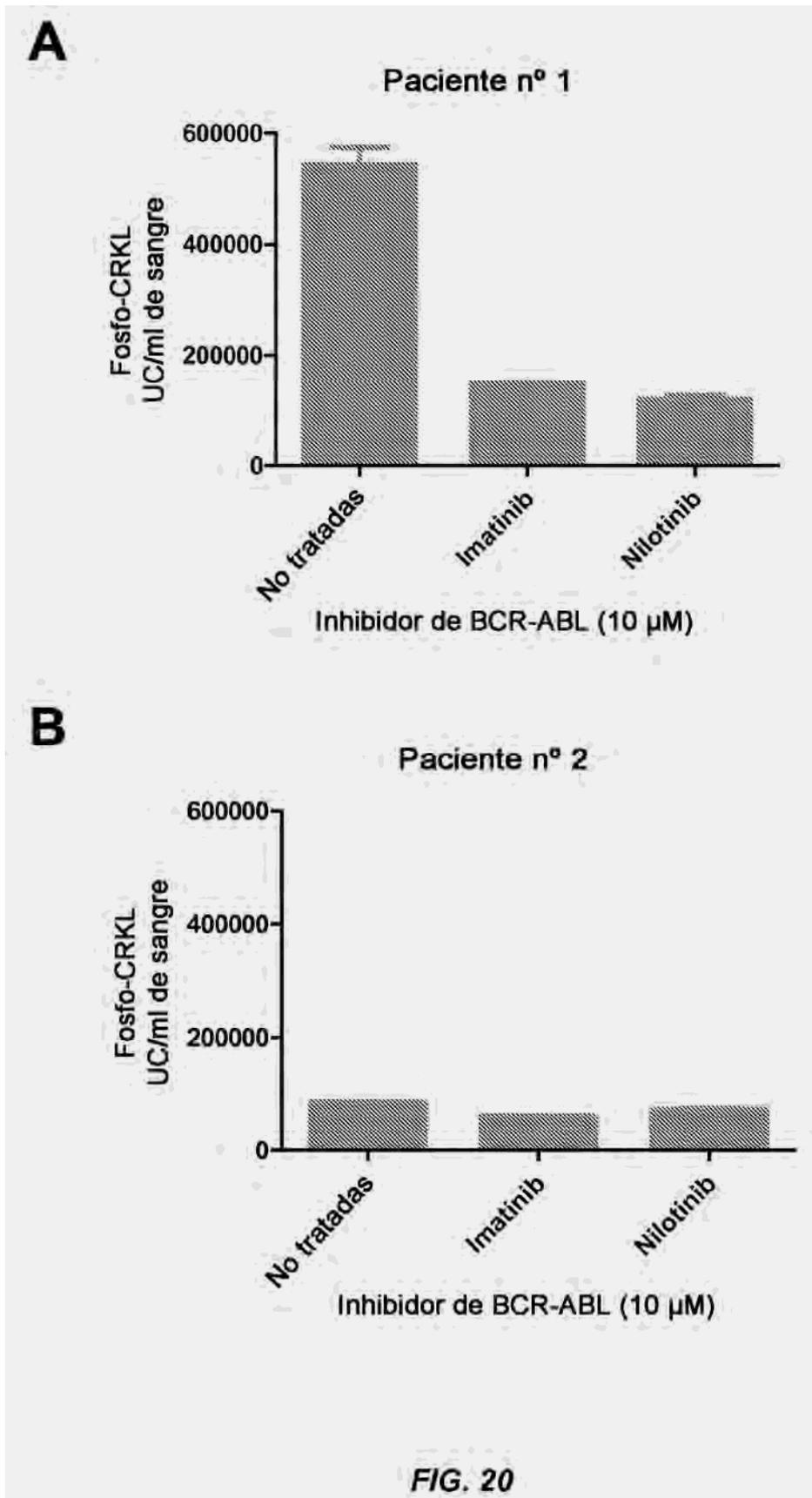
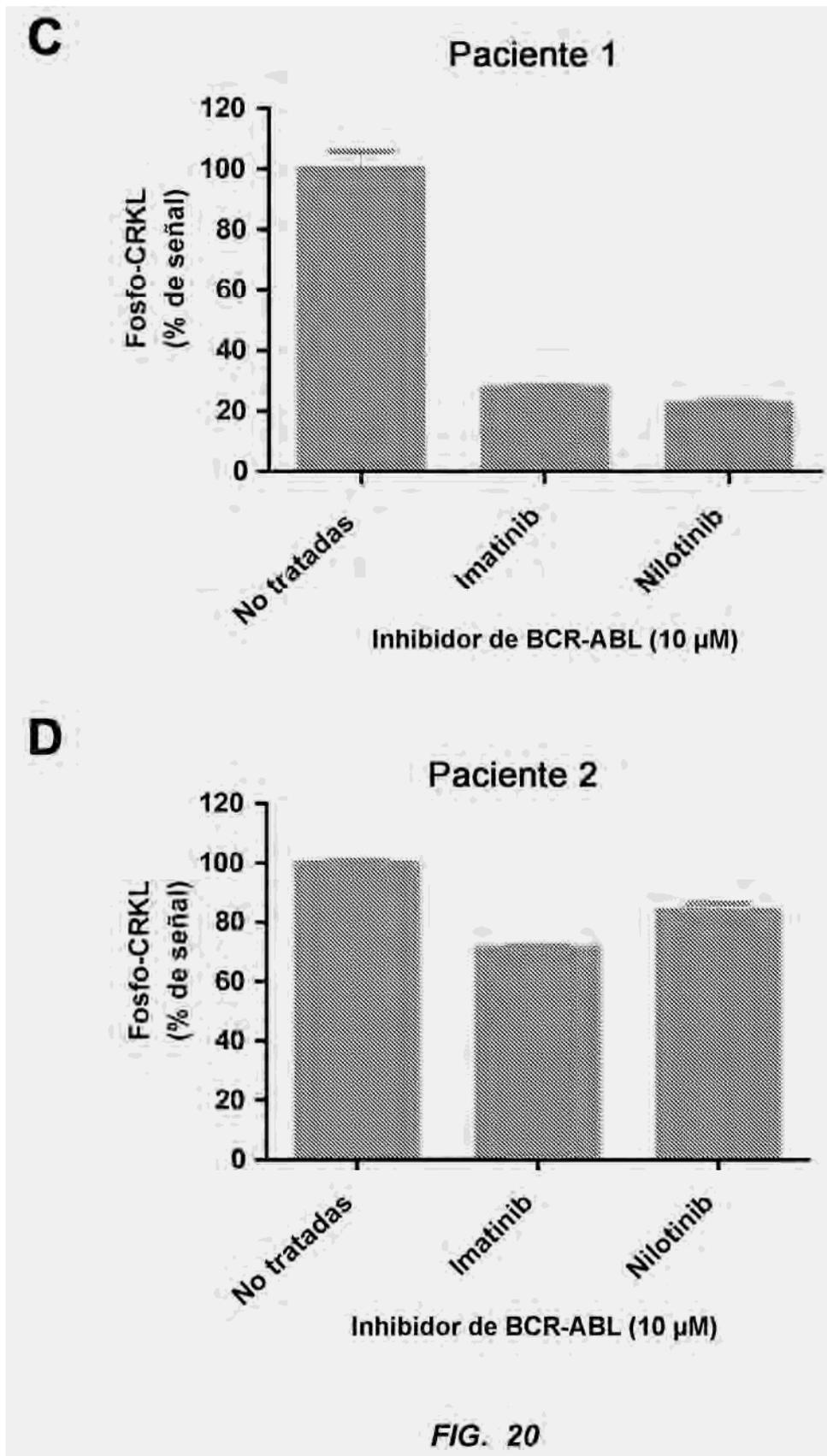
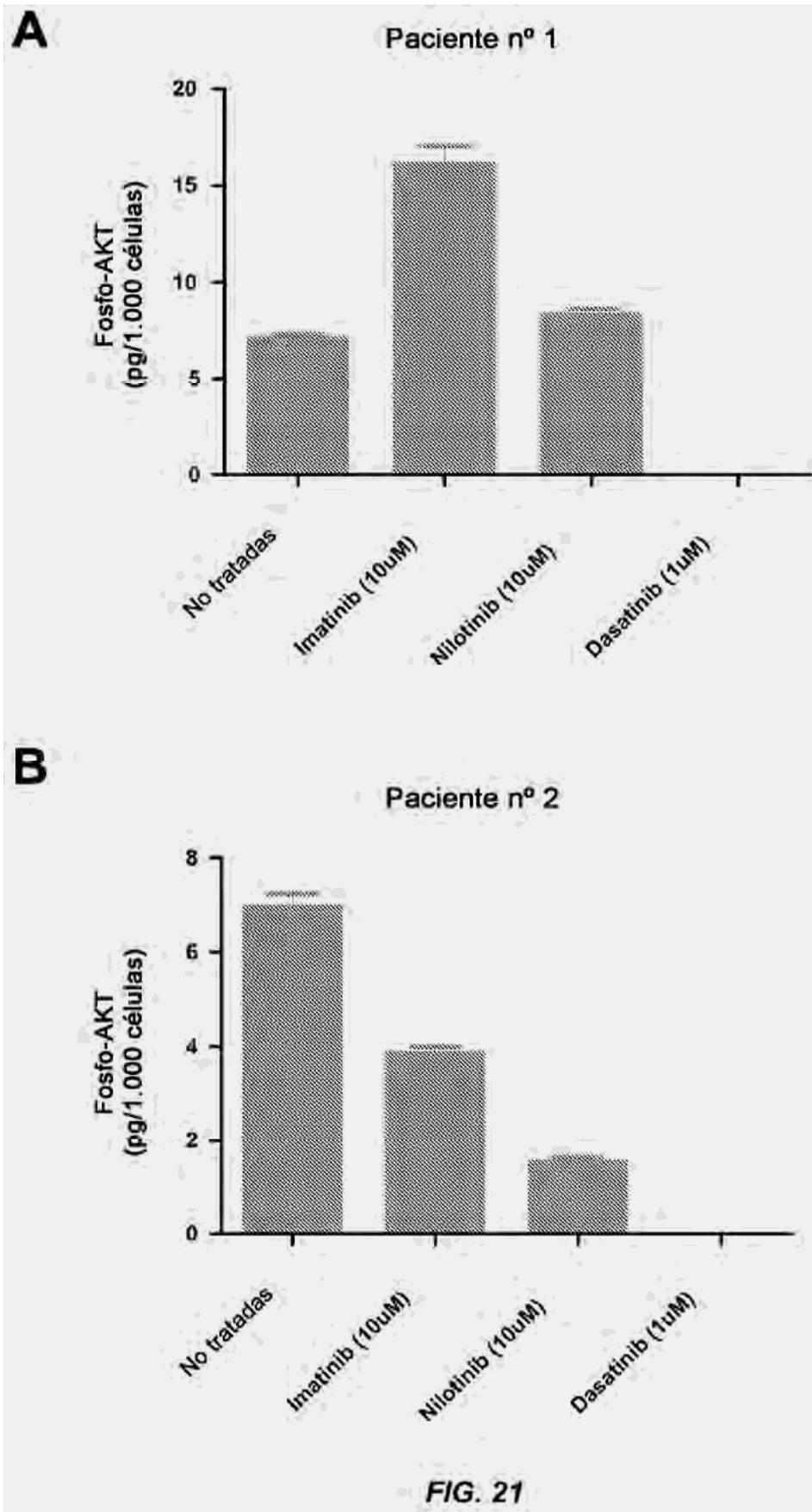


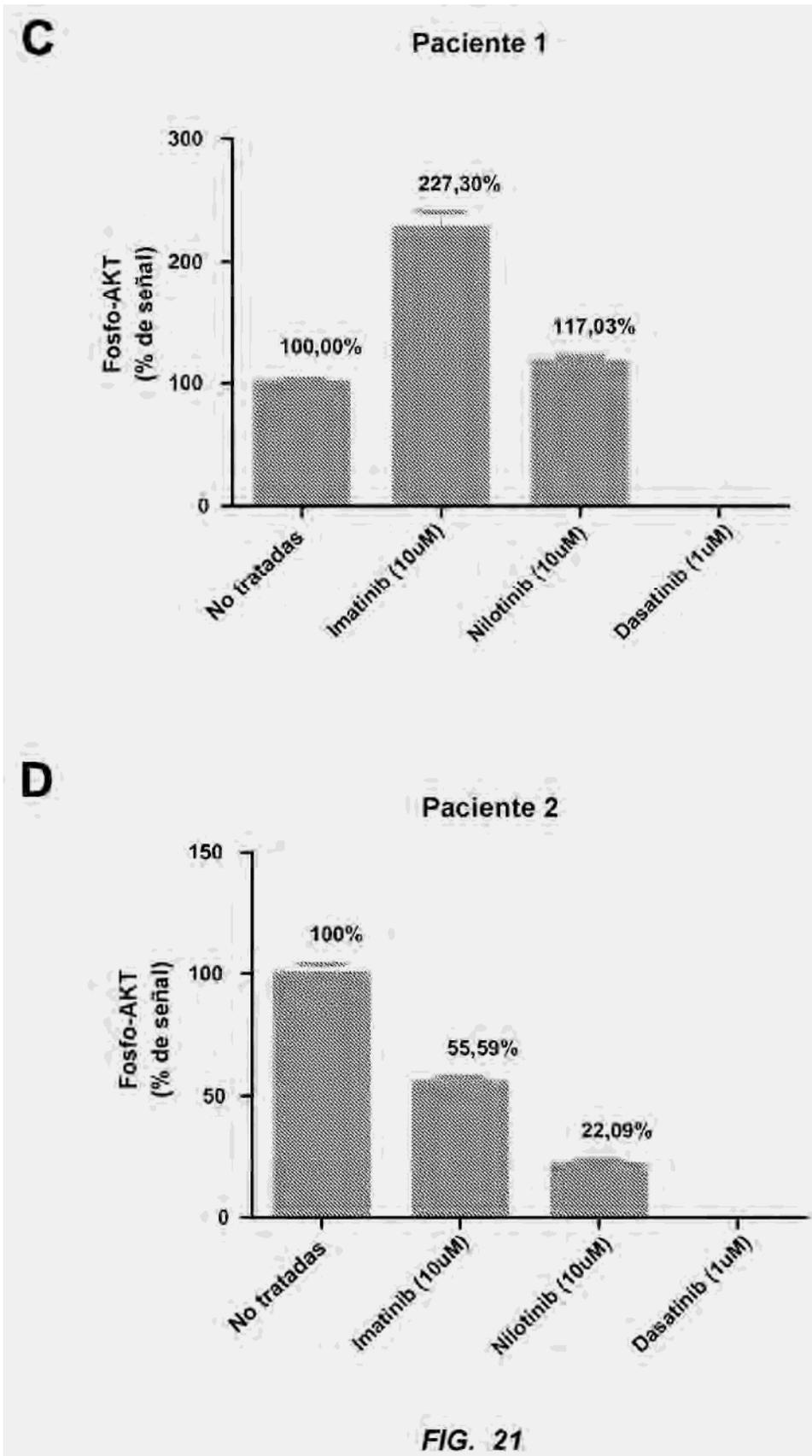
FIG. 18

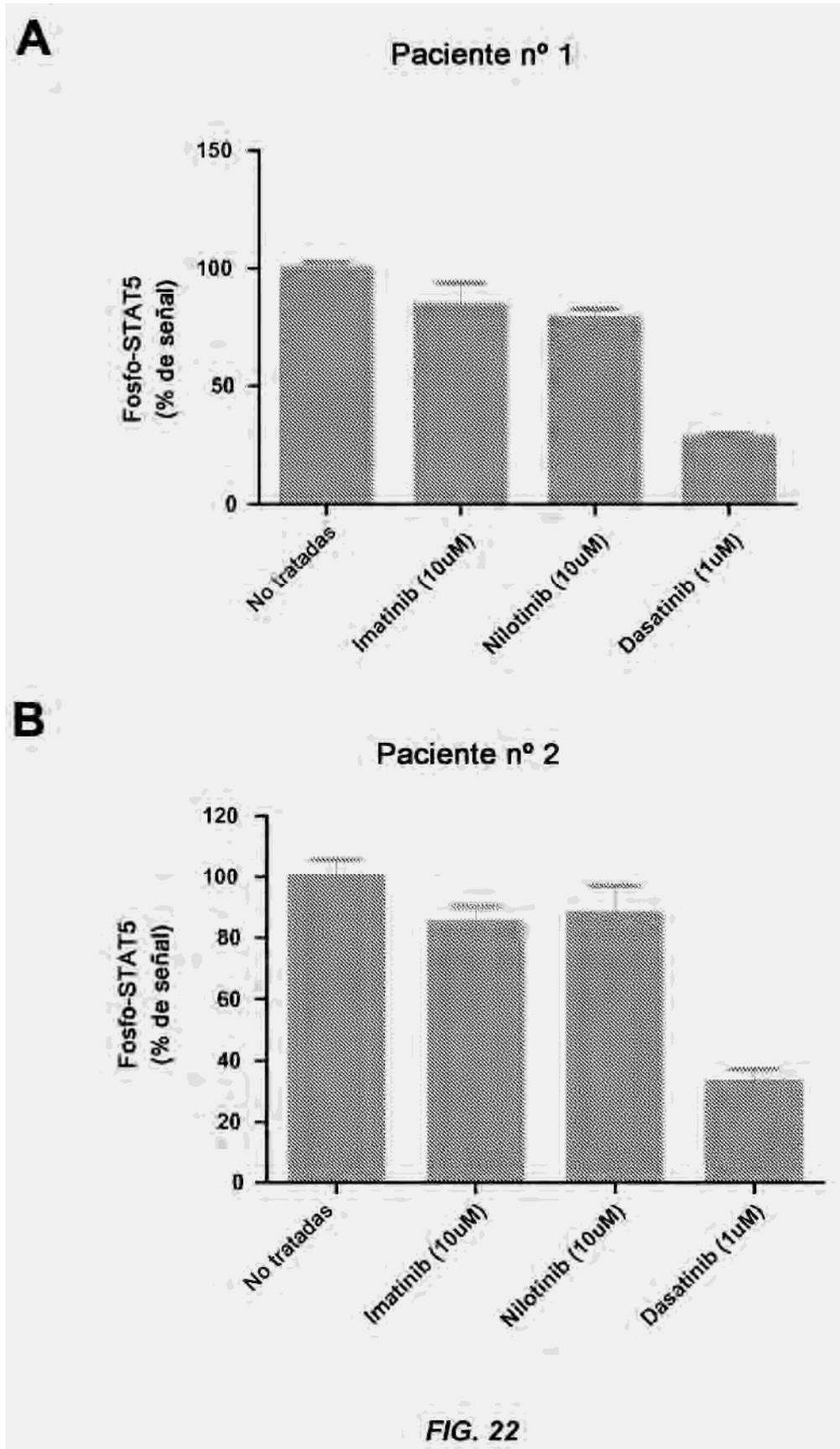


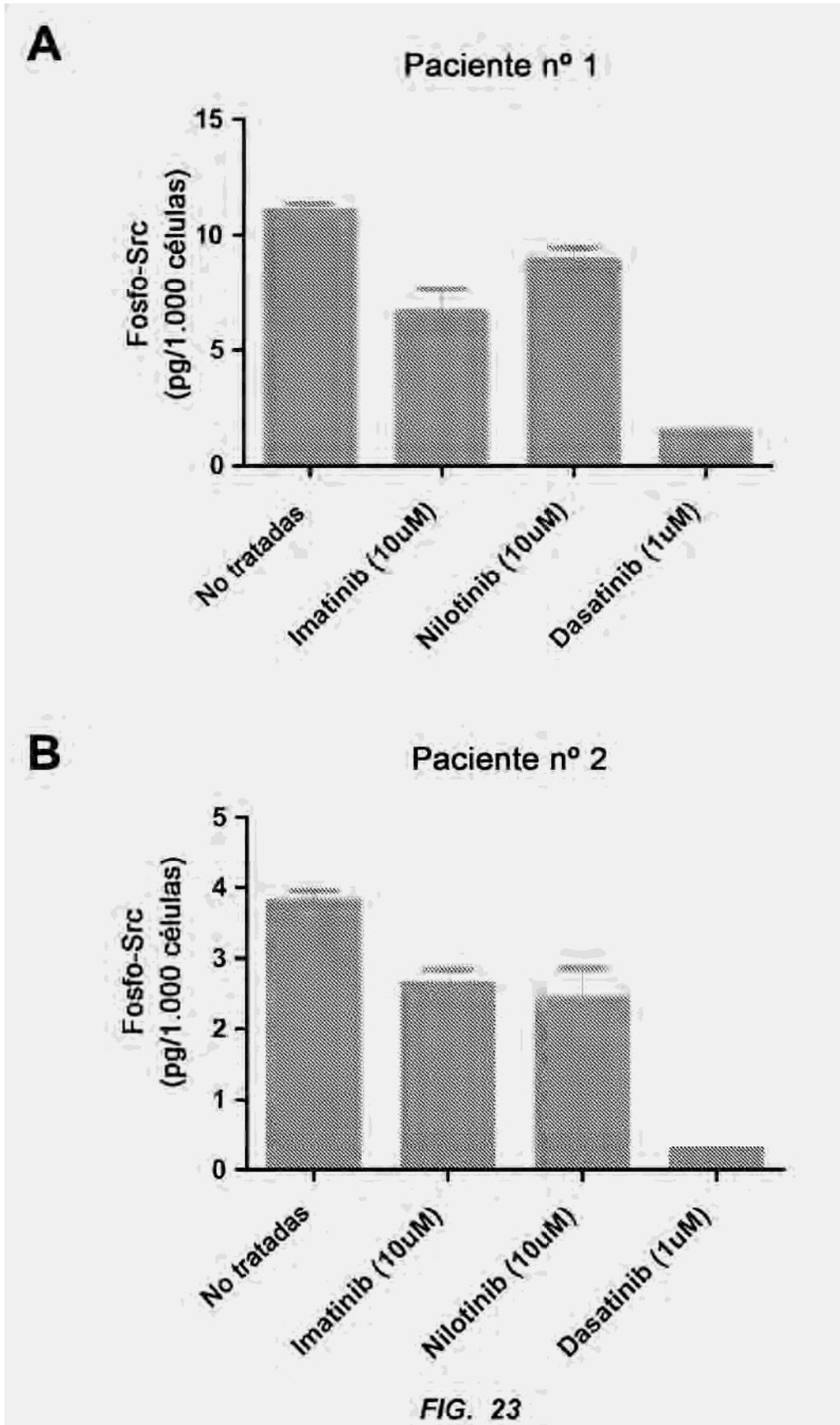


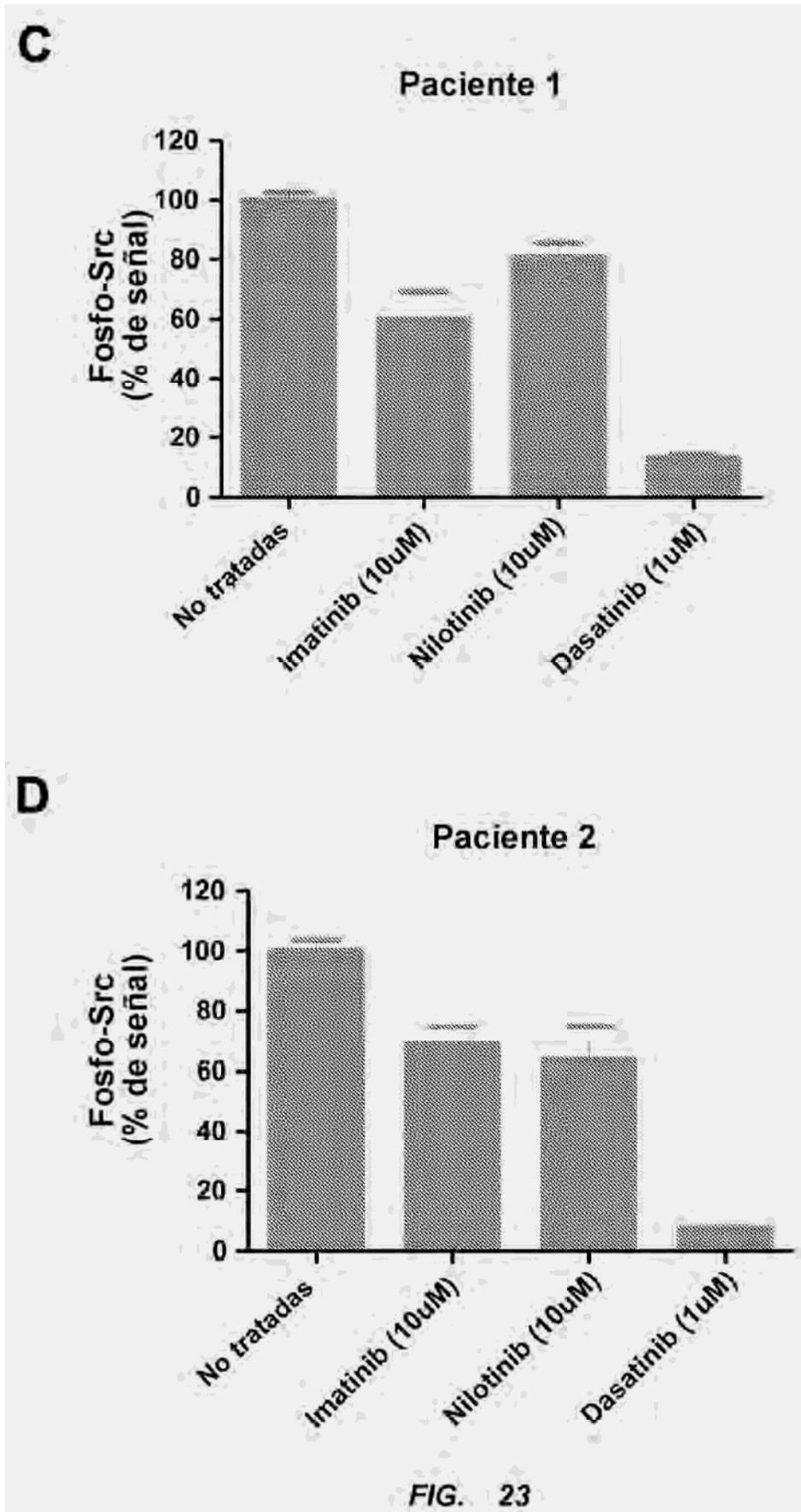












Paciente	Extr. sangre	Tratamiento	Observaciones
1	3	Gleevec	
2	6	Gleevec	Diagnóstico reciente
3	7	Sprycel	
4	4	Gleevec	
5	5	Gleevec	
6	12	Gleevec	
7	6	Gleevec	
8	5	Posible progresión	Cambio a Sprycel
9	1	Gleevec	
10	3	Gleevec	
11	3	Gleevec	
12	3	Gleevec	
13	1	Gleevec	
14	9	Sprycel	Nuevo diagnóstico
15	1	Gleevec	
16	1	Post-tratamiento	
17	4	Sprycel	
18	5	Posatinib	
19	3	Tasigna	Nuevo diagnóstico
20	6	Sprycel	Nuevo diagnóstico
21	2	Hidroxiurea	
22	1	Gleevec	
23	2	Gleevec	Diagnóstico reciente
24	1	Gleevec	Diagnóstico reciente
25	3	Tasigna	Diagnóstico reciente
26	1	Gleevec	Diagnóstico reciente
27	1	Gleevec	Nuevo diagnóstico

FIG. 24

Paciente	Muestra	Extr.	Recuento celular	Razón de ARNm	pBcr-Abl	p / WBC (%)	tBcr-Abl	t / WBC (%)	p/t	Observaciones
2	2	2/2	1.49E+07	47.53%	128,592	0.866	no determinado			Gleevec
	5	3/2	6.00E+06	17.92%	49,101	0.820	42,062	0.701	1.17	
	16	5/11	3.45E+06	0.00%	1,517	0.044	15,177	0.440	0.09	
	20	6/1	5.55E+06	5.46%	3,340	0.060	10,217	0.180	0.33	
	60 *	10/12	6.75E+06	4.84%	17,084	0.253	16,316	0.242	1.05	
	89 *	12/21	5.50E+06	2.21%	13,666	0.248	11,508	0.209	1.19	
3	3	2/7	4.00E+06	0.00%	6,057	0.151	2,547	0.063	2.38	Sprycel
	9	4/4	8.50E+06	0.00%	7,823	0.092	1,836	0.022	4.26	
	35 *	7/25	7.65E+06	0.00%	2,657	0.035	2,777	0.036	0.96	
	45 *	8/22	4.90E+06	0.01%	8,615	0.176	9,370	0.191	0.92	
4	4	2/15	6.30E+06	1.72%	6,142	0.097	2,454	0.039	2.50	Gleevec
	7	3/22	4.40E+06	0.57%	2,008	0.046	3,132	0.071	0.64	
	27	6/28	3.55E+06	0.19%	7,011	0.197	5,770	0.1625	1.22	
	55 *	9/27	3.00E+06	0.13%	9,065	0.302	2,554	0.085	3.55	
8	18	5/18	6.90E+06	4.53%	5,353	0.077	45,644	0.682	0.12	Posible progresión Sprycel
	25	6/20	7.10E+06	1.32%	4,360	0.061	33,809	0.476	0.13	
	31 *	7/18	3.40E+06	0.35%	2,263	0.067	14,369	0.423	0.16	
	44 *	8/18	5.50E+06	0.04%	2,421	0.044	2,996	0.054	0.81	
	61 *	10/13	7.50E+06	0.01%	1,887	0.025	4,825	0.640	0.39	
14	28	6/28	1.36E+07	51.18%	83,761	0.616	115,074	0.846	0.73	Hidroxiurea Sprycel
	48 *	8/29	5.25E+06	1.17%	8,257	0.157	32,735	0.624	0.25	
	57 *	10/3	6.75E+06	0.08%	5,616	0.083	3,585	0.053	1.56	
18	38 *	7/28	1.53E+07	36.19%	123,992	0.810	447,903	2.930	0.28	Tasigna Ponatinib
	41 *	8/11	1.65E+07	51.30%	104,505	0.630	286,432	1.740	0.36	
	50 *	9/7	2.60E+07	52.35%	95,679	0.370	705,569	2.710	0.14	
	71 *	11/9	5.25E+06	1.03%	12,157	0.232	24,805	0.472	0.49	

FIG. 25

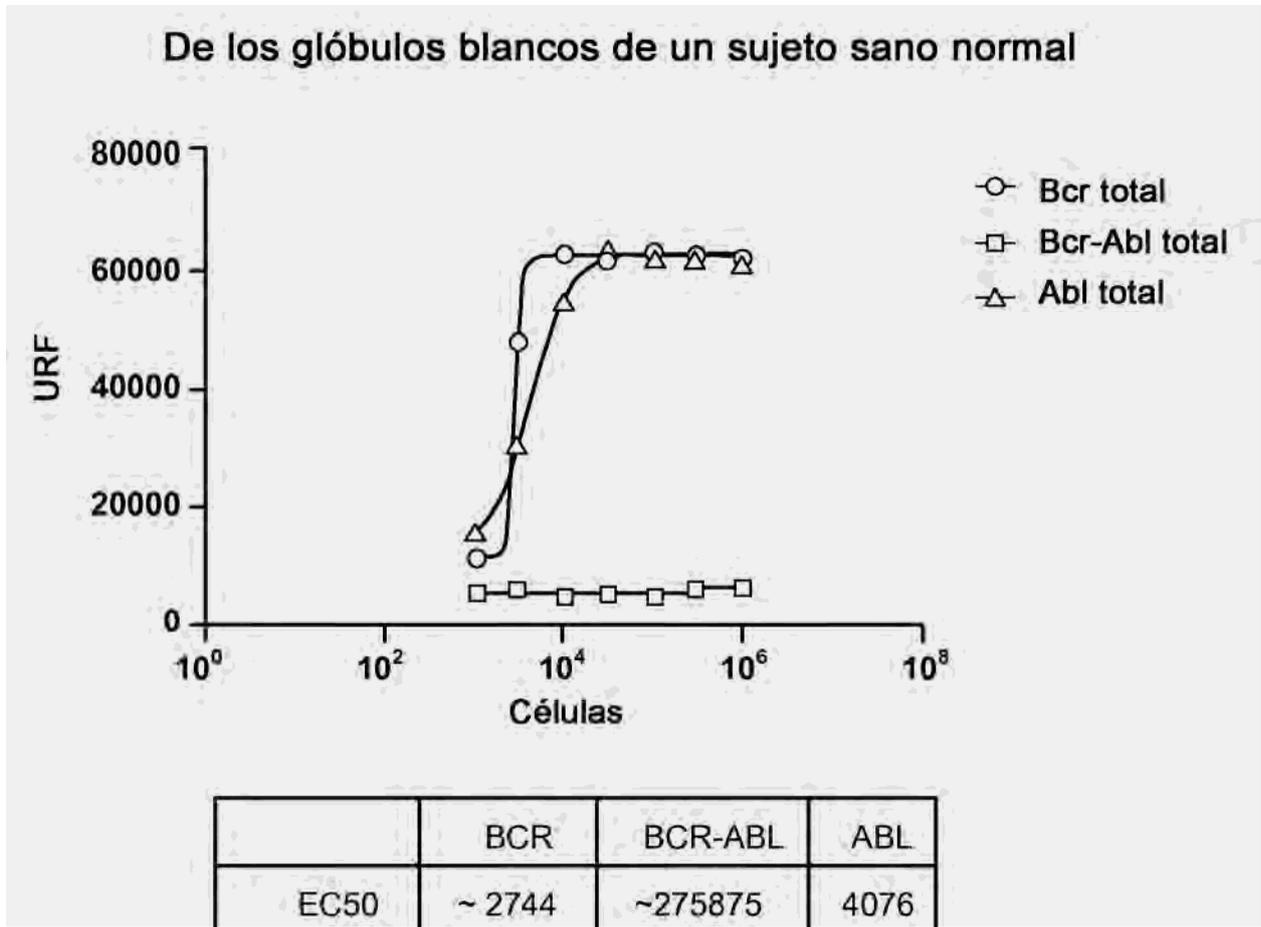


FIG. 26

