

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 506**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2009 E 13192129 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2708894**

54 Título: **Sistema de ensayo para la evaluación de la oncogenicidad, progresión tumoral y eficacia de un tratamiento**

30 Prioridad:

**25.01.2008 US 23570 P**

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

**14.11.2016**

73 Titular/es:

**BERG LLC (100.0%)  
1845 Elm Hill Pike  
Nashville, TN 37210, US**

72 Inventor/es:

**NARAIN, NIVEN RAJIN y  
PERSAUD, INDUSHEKHAR**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 589 506 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

Sistema de ensayo para la evaluación de la oncogenicidad, progresión tumoral y eficacia de un tratamiento

### 5 Antecedentes

El cáncer es actualmente una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. La investigación reciente ha aumentado enormemente la comprensión de muchos de los mecanismos moleculares de la tumorigénesis y ha proporcionado numerosas nuevas vías para el tratamiento del cáncer. Se usan clínicamente sistemas y métodos para evaluar el estadio de un cáncer, así como su oncogenicidad y el grado de progresión tumoral, en un intento por determinar tratamientos apropiados. Tales sistemas y métodos también pueden utilizarse para evaluar la eficacia de cualquier tratamiento utilizado.

15 Siguen siendo deseables métodos mejorados para el tratamiento de enfermedades, incluyendo cáncer, que permitan la evaluación de la oncogenicidad, progresión tumoral y eficacia de un tratamiento.

Wachsberger Phyllis *et al.* (es decir, Clinical Cancer Research, The American Association For Cancer Research, US, vol. 9, n.º 6, 1 de junio de 2003, páginas 1957 - 1971) comentan las respuestas tumorales a radiación ionizante combinada con antiangiogénesis o agentes de direccionamiento vascular y exploran mecanismos de interacción. Singhal S (es decir, Clinical Cancer Research, vol. 11, n.º 11, 1 de junio de 2005, páginas 3974 - 3986) comenta una revisión de investigación clínica del cáncer, y en particular implicaciones de pronóstico de biomarcadores del ciclo celular, la apoptosis y la angiogénesis en cáncer de pulmón de células no pequeñas. El documento WO 2005/103281 comenta biomarcadores de plaquetas para la detección de enfermedad..

### 25 Sumario

La presente descripción proporciona kits de ensayo y sistemas adecuados para su uso en el tratamiento del cáncer. Los sistemas y kits de la presente descripción permiten determinar la naturaleza cancerosa de una muestra de tejido, tal como evaluando el estadio de un cáncer, así como su oncogenicidad y el grado de progresión tumoral. Los kits y sistemas de la presente descripción también pueden utilizarse para determinar tratamientos apropiados así como la eficacia de cualquier tratamiento utilizado. En realizaciones, sistemas y kits de la presente descripción pueden utilizarse ensayos, en realizaciones ELISA, para examinar los niveles de marcadores apoptóticos, marcadores de angiogénesis, marcadores de inmunomodulación y/o marcadores del ciclo celular, y pueden compararse muestras de un paciente tomadas a diferentes tiempos para determinar la oncogenicidad de un cáncer, la progresión tumoral y la eficacia de un tratamiento contra el cáncer.

En realizaciones, un kit o sistema de la presente descripción puede utilizar un programa de software para analizar los datos generados por los ensayos de la presente descripción. En realizaciones, un kit o sistema de la presente descripción puede incluir un ensayo para medir un nivel de una proteína en una muestra de tejido implicada en un proceso celular tal como apoptosis, angiogénesis, inmunomodulación, desarrollo del ciclo celular y combinaciones de los mismos; y al menos un procesador acoplado a un medio legible por ordenador configurado para almacenar un conjunto de instrucciones que pueden ejecutarse por el al menos un procesador, incluyendo las instrucciones comparar un nivel de la proteína en la muestra de tejido con un valor de referencia, y determinar si la muestra de tejido es cancerosa o no.

También se proporcionan métodos que utilizan tales kits y sistemas. En realizaciones, los métodos de la presente descripción pueden incluir métodos para determinar la naturaleza cancerosa de una muestra de tejido, tal como evaluando la oncogenicidad de un cáncer, determinando la progresión de un tumor, determinando la eficacia de un tratamiento contra el cáncer, combinaciones de los mismos, y similares.

### 50 Descripción de los dibujos

Se describirán a continuación en el presente documento diversas realizaciones de la presente descripción con referencia a las figuras en las que:

55 la figura 1 incluye el análisis de la apoptosis de una muestra a partir de un informe de ensayo que puede generarse con los sistemas y kits de la presente descripción;

60 la figura 2 incluye el análisis de la angiogénesis de una muestra a partir de un informe de ensayo que puede generarse con los sistemas y kits de la presente descripción;

la figura 3 incluye el análisis de la inmunomodulación de una muestra a partir de un informe de ensayo que puede generarse con los sistemas y kits de la presente descripción; y

65 la figura 4 incluye el análisis del ciclo celular de una muestra a partir de un informe de ensayo que puede generarse con los sistemas y kits de la presente descripción.

La invención se define, entre otros, por los siguientes puntos:

1. Un método que comprende:

5 medir los niveles de proteínas implicadas en angiogénesis en una muestra de tejido obtenida de un animal, en el que las proteínas comprenden VEGF, HIF-1 $\alpha$ , angiostatina y bFGF;

10 comparar los niveles de las proteínas en la muestra de tejido con un valor de referencia; en el que

15 (A) un aumento en VEGF, un aumento en HIF-1 $\alpha$ , un aumento en bFGF y una disminución en angiostatina indica que la muestra es cancerosa; o

(B) una disminución en VEGF, una disminución en HIF-1 $\alpha$ , una disminución en bFGF y un aumento en angiostatina indica que un tratamiento es eficaz en tratar el cáncer en el animal.

20 2. Un sistema para llevar a cabo el método del punto 1, que comprende al menos un procesador acoplado a un medio legible por ordenador configurado para almacenar un conjunto de instrucciones que pueden ejecutarse por el al menos un procesador, incluyendo las instrucciones:

25 comparar los niveles de proteínas en una muestra de tejido de un animal con un valor de referencia, en el que las proteínas comprenden VEGF, HIF-1 $\alpha$ , angiostatina y bFGF; y en el que

(A) un aumento en VEGF, un aumento en HIF-1 $\alpha$ , un aumento en bFGF y una disminución en angiostatina indica que la muestra es cancerosa; o

30 (B) una disminución en VEGF, una disminución en HIF-1 $\alpha$ , una disminución en bFGF y un aumento en angiostatina indica que un tratamiento es eficaz en tratar el cáncer en el animal.

3. Un sistema que comprende:

35 ensayos para medir los niveles de proteínas implicadas en angiogénesis en una muestra de tejido, en el que las proteínas consisten en VEGF, HIF-1 $\alpha$ , angiostatina y bFGF; y al menos un procesador acoplado a un medio legible por ordenador configurado para almacenar un conjunto de instrucciones que pueden ejecutarse por el al menos un procesador, incluyendo las instrucciones las etapas de:

40 comparar los niveles de las proteínas en la muestra de tejido con un valor de referencia; y en el que

(A) un aumento en VEGF, un aumento en HIF-1 $\alpha$ , un aumento en bFGF y una disminución en angiostatina indica que la muestra es cancerosa; o

45 (B) una disminución en VEGF, una disminución en HIF-1 $\alpha$ , una disminución en bFGF y un aumento en angiostatina indica que un tratamiento es eficaz en tratar el cáncer en el animal.

50 4. El método del punto 1, realización (A), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal de una región de tejido normal; o en el que el valor de referencia comprende un nivel conocido de las proteínas.

5. El sistema del punto 2 ó 3, realización (A), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal de una región de tejido normal; o en el que el valor de referencia comprende un nivel conocido de las proteínas.

55 6. El método del punto 1, realización (B), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal antes o durante el tratamiento del cáncer.

60 7. El sistema del punto 2 ó 3, realización (B), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal antes o durante el tratamiento del cáncer.

### Descripción detallada

65 La presente descripción proporciona un sistema de ensayo que examina proteínas celulares que desempeñan un papel vital en la apoptosis (muerte celular programada), angiogénesis (crecimiento de nuevos vasos sanguíneos), inmunomodulación y factores del ciclo celular contribuyendo de ese modo al nivel global de oncogenicidad. Una

célula cancerosa presenta señalización alterada de la expresión génica/proteica de factores relacionados con los procesos mencionados anteriormente. Esto conduce a: un desequilibrio de la homeostasis; pérdida de vigilancia inmunitaria y control apoptótico; mutaciones de la autorregulación inducida por tumores; y aumento de la vasculatura. Estos se combinan para convertirse en los factores desencadenantes que impulsan la aparición de oncogénesis. Por ejemplo, un aumento de la expresión de Bcl-2, que previene la apoptosis, combinado con una regulación por disminución de la expresión Bax, puede ser indicativo de resistencia apoptótica. Por tanto, la medición de la expresión de proteínas como Bax y Bcl-2 antes y después de un tratamiento contra el cáncer puede proporcionar una perspectiva de si un régimen de tratamiento restaura eficazmente el potencial apoptótico en tejido maligno.

Según la presente descripción, se proporcionan sistemas y kits que incluyen múltiples ensayos que pueden utilizarse para evaluar la malignidad de un cáncer, incluyendo su oncogenicidad, así como la progresión de tumores y la eficacia de tratamientos. Puede utilizarse un componente del ensayo de apoptosis del sistema para indicar si las células están experimentando muerte celular programada a una tasa normal, o si las células no están muriendo como deberían, lo que podría ser indicativo de la naturaleza maligna de las células. Una parte del ensayo de angiogénesis del sistema puede medir las secreciones y los receptores celulares de células cancerosas para determinar su capacidad para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos que pueden proporcionar nutrientes para facilitar el crecimiento tumoral.

Estos valores pueden utilizarse para cuantificar la progresión de un tumor y la eficacia de tratamientos antiangiogénicos. Pueden utilizarse mediciones de la inmunomodulación para indicar la respuesta inmunitaria para el crecimiento no controlado de células y el nivel de infiltración en el microentorno tumoral. Finalmente, pueden utilizarse factores del ciclo celular para evaluar la tasa de recambio celular, que es indicativa de la agresividad con la que el tumor puede estar creciendo.

Las cuatro categorías (apoptosis, angiogénesis, inmunomodulación y factores del ciclo celular) pueden clasificarse en una escala numérica individualmente, sin embargo, un médico puede evaluar los cuatro valores dados conjuntamente, para monitorizar y elegir y seguir un régimen de tratamiento para un tumor maligno.

Una ventaja tecnológica de un kit o sistema de ensayo de la presente descripción incluye el software que acompaña al kit o sistema que analizará las proteínas para clasificar la progresión tumoral y la eficacia de un tratamiento en una lectura numérica sencilla. En una realización, pueden analizarse los niveles de tantas como 25 proteínas para clasificar la progresión tumoral y la eficacia de un tratamiento en una lectura numérica sencilla.

#### Construcción de un kit de ELISA:

En realizaciones, el sistema de ensayo de la presente descripción puede incluir un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Puede utilizarse cualquier sistema de ELISA dentro del ámbito de los expertos en la técnica. En realizaciones, el kit de ELISA puede prepararse usando una ruta directa. En otras realizaciones, el kit de ELISA puede prepararse usando una ruta indirecta.

Para un kit de ELISA preparado usando una ruta directa, un método adecuado para producir el kit de ELISA incluye la unión de un anticuerpo de interés a la base de una placa de 96 pocillos de plástico. Entonces se dispensa una muestra al pocillo y la proteína diana se unirá a los anticuerpos. Tras eliminar por lavado las proteínas que no reaccionaron, puede añadirse a los pocillos en la placa un segundo anticuerpo monoclonal unido a una enzima de registro. Este anticuerpo se une al complejo de proteína en el fondo de los pocillos. Se eliminan las proteínas que no se unen al complejo lavando los pocillos. Posteriormente, se añade un sustrato enzimático a los pocillos para iniciar una reacción con la enzima de registro. La intensidad del cambio de color depende de la concentración de la enzima de registro unida que se correlaciona con la concentración de la proteína diana.

Para un kit de ELISA preparado usando una ruta indirecta, un método indirecto mide los anticuerpos presentes en muestras de un paciente (por ejemplo suero). Se absorbe un antígeno en la pared de las placas de 96 pocillos. Se añade la muestra del paciente al pocillo y si está presente el anticuerpo de interés (en el suero del paciente), se unirá al antígeno. Tras lavar las proteínas que no reaccionaron, se añade un segundo anticuerpo con una enzima de registro para que se una con los anticuerpos presentes en la muestra del paciente. La adición de un sustrato enzimático producirá un cambio colorimétrico y la intensidad del cambio de color se medirá usando un espectrómetro UV-Vis.

En algunas realizaciones, un sistema de ensayo de la presente descripción puede basarse en un método de ELISA directo. Los pocillos de la placa pueden recubrirse con anticuerpos de interés y pueden añadirse muestras homogeneizadas a la placa para cuantificar la expresión proteica de las proteínas apoptóticas, angiogénicas, inmunomoduladoras y del ciclo celular.

Otras tecnologías que pueden utilizarse con un sistema de ensayo de la presente descripción están dentro del ámbito de los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, tinción inmunohistoquímica, kits de inmunotransferencia de tipo Western, expresión génica para las proteínas correspondientes (incluyendo constructos

génicos para la expresión proteica) y estudios de proteómica que, en realizaciones, podrían incluir espectroscopía de masas.

5 Las tecnologías anteriores pueden usarse de manera similar para cuantificar la expresión de proteínas apoptóticas, angiogénicas, inmunomoduladoras y del ciclo celular, permitiendo de ese modo determinar la naturaleza cancerosa de una muestra de tejido, tal como evaluando el estadio de un cáncer, así como su oncogenicidad y el grado de progresión tumoral.

10 Marcadores celulares examinados mediante el sistema de ensayo

10 Marcadores apoptóticos

Puede examinarse cualquier marcador apoptótico usando los sistemas de ensayo de la presente descripción. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a:

- 15 1) Bcl-2: El linfoma de células B 2 es una proteína antiapoptótica y se regula por incremento en células oncogénicas.
- 20 2) Bax: Un miembro proapoptótico de la familia de la proteína Bcl-2, se inhibe su actividad por niveles de Bcl-2 aumentados en > 65% de todos los cánceres.
- 3) Bid: Una proteína de la subfamilia BH3 que forma dímeros con miembros pro/anti y anti-Bcl-2 para desencadenar que la mitocondria libere factores para iniciar el daño al ADN.
- 25 4) Citocromo c: Se libera en presencia de señales proapoptóticas y forma un complejo con Apaf-1 (factor de activación de proteasa apoptótica 1: una proteína que participa en la apoptosis) para iniciar la actividad de la familia CARD (CARD es el dominio de reclutamiento de caspasas: dominios encontrados en proteínas que median en la formación de complejos mayores y desempeñan un papel en procesos incluyendo, por ejemplo, apoptosis). (Por ejemplo Casp-9, Casp-6 y Casp-3).
- 30 5) Caspasa-3: Miembro clave de la familia CARD que es el mediador citosólico de punto final que precede al inicio de la fragmentación del ADN en el núcleo.
- 35 6) p53: p53 es un factor de transcripción que regula el ciclo celular y por tanto funciona como supresor de tumores. Es importante en organismos multicelulares ya que ayuda a suprimir el cáncer.

Marcadores angiogénicos

40 Puede examinarse cualquier marcador angiogénico y/o constructo génico usando los sistemas de ensayo de la presente descripción. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a:

- 45 1) VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular. Principal proteína responsable del desarrollo de lechos vasculares que alimentan nutrientes a los tumores y proporciona fundamento para las metástasis. Liberado por células para promover la formación de nuevos vasos.
- 2) HIF-1 $\alpha$ : Factor 1 alfa inducido por hipoxia. Liberado por las paredes endoteliales del tumor para disminuir los niveles de oxígeno (hipoxia), lo que conduce a fuentes alternativas de ATP por medio de flujo glicolítico. También regula por incremento VEGF y por tanto la angiogénesis.
- 50 3) bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico. Induce replicación, migración y proteólisis extracelular de células endoteliales.
- 4) Angiostatina: Factor antiangiogénico que inhibe la formación de nuevos vasos.

55 Inmunomodulación

Puede examinarse cualquier marcador indicativo de inmunomodulación usando los sistemas de ensayo de la presente descripción. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a:

- 60 1) TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral-alfa. Una citocina pleiotrópica que provoca necrosis en algunos tipos de células tumorales y promueve el crecimiento en otras células.
- 65 2) IL-6: Interleucina-6. Una respuesta proinflamatoria secretada por células T. Se ha mostrado que IL-6 promueve el crecimiento tumoral y es un indicador de pronóstico de muchos cánceres ya que mitiga la implicación inmunitaria aumentando posiblemente el efecto angiogénico.

Ciclo celular

Puede examinarse cualquier marcador indicativo de la situación de una célula en el desarrollo del ciclo celular usando los sistemas de ensayo de la presente descripción. Tales marcadores incluyen, pero no se limitan a:

- 5 1) p21: un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas (cdk), y es un mediador clave de la detención del ciclo celular dependiente de p53 tras daño al ADN.
- 10 2) p27: un inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas que controla la progresión del ciclo celular en la fase G1. (La fase G1 es el periodo en el ciclo celular durante la interfase, antes de la mitosis, citocinesis y la fase S. Para muchas células, esta fase es el periodo principal de crecimiento celular durante su vida).

Biopsias de pacientes

Según la presente descripción, en realizaciones, pueden tomarse muestras de tejido de un paciente y someterse a los ensayos descritos anteriormente. Puede utilizarse cualquier método dentro del ámbito de un experto en la técnica para obtener muestras de tejido. En realizaciones, puede utilizarse una biopsia para obtener una muestra de tejido.

Para una biopsia, pueden extraerse dos tipos de muestras de un paciente. La primera muestra puede tomarse de una lesión sospechosa de crecimiento anómalo. La segunda muestra puede tomarse de una región de tejido normal. Estas muestras pueden someterse a ensayo para detectar las diferencias en los marcadores oncogénicos descritos anteriormente para determinar la diferencia celular y el grado de oncogenicidad. Las muestras pueden homogeneizarse y colocarse en un tampón de lisis frío que contiene inhibidores de proteasas y fosfatasa para impedir la escisión y degradación de proteínas. En realizaciones, las muestras pueden congelarse antes de las pruebas. Esto puede ser deseable cuando hay un periodo de tiempo prolongado entre la obtención de las muestras y las pruebas. Cualquier proceso de congelación utilizado puede ayudar en el lisado de las células.

Una vez que las muestras están listas para las pruebas, pueden descongelarse y homogeneizarse. Las muestras pueden centrifugarse a aproximadamente 4°C para eliminar cualquier residuo celular no homogeneizado. Entonces pueden cuantificarse las proteínas usando los ensayos de proteínas que acompañan al kit de ensayo.

Diseño del kit

El kit de ensayo puede utilizar cualquier ensayo adecuado, incluyendo un ensayo ELISA tal como se describió anteriormente. En realizaciones, el kit puede utilizar un ensayo preparado mediante el método de ELISA directo descrito anteriormente. Pueden fijarse anticuerpos para cada proteína a la placa de 96 pocillos para las proteínas apoptóticas, de angiogénesis, de inmunomodulación y del ciclo celular.

Sección de ensayo de apoptosis

El diseño del kit incluye pocillos recubiertos con el anticuerpo de interés para una proteína dada. En algunas realizaciones, puede medirse Bcl-2. Pueden diluirse patrones que acompañan al kit y añadirse por duplicado a los pocillos recubiertos con anticuerpos frente a Bcl-2. Entonces puede añadirse cada muestra diana del paciente de una lesión sospechosa de crecimiento anómalo a cuatro pocillos junto con la muestra de tejido normal tal como piel obtenida por biopsia del paciente. Las proteínas Bcl-2 presentes en la muestra se unirán al anticuerpo recubierto sobre la base de la placa. Los pocillos pueden lavarse con reactivos y puede añadirse a los pocillos un anticuerpo secundario con una enzima de registro. El segundo anticuerpo añadido se unirá al complejo unido a la placa. Los pocillos pueden lavarse y puede añadirse un sustrato enzimático y la intensidad del ensayo colorimétrico puede medirse usando espectroscopía. Los otros niveles de proteínas se miden usando el mismo concepto.

Una vez se cuantifican los niveles de proteínas individuales, las 6 proteínas pueden compararse. Puede cuantificarse cualquier proteína apoptótica utilizando estos métodos. En realizaciones, las proteínas apoptóticas que pueden cuantificarse utilizando estos métodos incluyen:

- 55 1) Bcl-2
- 2) Bax
- 60 3) p53
- 4) Bid
- 5) Caspasa-3
- 65 6) Citocromo c

Para los marcadores anteriores, un aumento en Bcl-2, o una disminución en Bax, Bid, caspasa-3, citocromo C, sería indicativo de una disminución en la apoptosis, que a su vez es indicativo de un cáncer agresivo. A la inversa, una disminución en Bcl2, o un aumento en Bax, Bid, caspasa-3 o citocromo c, sería indicativo de un aumento en la apoptosis, que a su vez es indicativo de que un tratamiento dado es eficaz en el tratamiento del cáncer.

#### Análisis de datos mediante software

Tal como se indicó anteriormente, puede incluirse un programa de software con kits de la presente descripción. Tal como se indicó anteriormente, pueden medirse los niveles de proteína basándose en la concentración de proteínas cargadas en cada pocillo. El software de análisis de datos que acompaña a los kits puede medir el nivel de la proteína de interés. Por ejemplo, en realizaciones, el software puede medir el nivel de Bcl-2 en comparación con los niveles de Bax. Estos valores se compararán con los valores de biopsias normales para determinar una diferencia significativa en Bcl-2 en relación con los niveles de Bax. Una razón de expresión de Bcl-2 que es significativamente superior a Bax, en realizaciones de aproximadamente 3:2, en otras realizaciones de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 10:1, indicaría un bajo nivel de apoptosis, es decir, esta razón debe ir acompañada por una desregulación global de la familia de proteínas Bcl-2 que conduce a un control apoptótico alterado. Puede utilizarse cualquier varianza estadística suficientemente baja para demostrar significación clínica.

Además, también pueden compararse los niveles de p53, Bid, caspasa-3 y citocromo c con muestras de tejido normal. Si hay una disminución en p53, caspasa-3, Bid y citocromo c, entonces puede concluirse que la muestra contiene células que son resistentes a la apoptosis, una de las características distintivas de la oncogenicidad.

A través de pruebas de validación extensas, pueden establecerse los niveles para cada línea de células cancerosas, así como un nivel para relacionar el valor obtenido mediante el software de análisis de datos con la gravedad del cáncer. La escala numérica puede ser de desde 1 - 15, en cuyo caso 15 se correlaciona con una alta resistencia de apoptosis y el diagnóstico de una línea celular oncogénica.

Los registros iniciales basados en los ensayos anteriores pueden almacenarse, con una visita de seguimiento para obtener una segunda biopsia para cuantificar cualquier cambio en el potencial apoptótico. Esto puede utilizarse para indicar la eficacia del tratamiento y ayudar al médico encargado a decidir si continuar con el tratamiento o cambiar el régimen de tratamiento antes del avance del estado de cáncer.

#### Sección de ensayo de angiogénesis

Puede analizarse cualquier componente indicativo de angiogénesis como parte de la porción de angiogénesis del sistema de ensayo de la presente descripción. En realizaciones, los componentes adecuados que pueden examinarse como parte de la porción de angiogénesis del sistema de ensayo de la presente descripción incluyen:

1) VEGF

2) HIF-1 $\alpha$

3) bFGF

4) Angiostatina

Pueden utilizarse métodos similares a los descritos anteriormente para cuantificar los factores apoptóticos para la comparación de factores angiogénicos a partir de muestras diana obtenidas de una lesión sospechosa de crecimiento anómalo con tejido normal. Una comparación de este tipo puede indicar si células en una lesión están estimulando la formación de nuevos vasos sanguíneos. Si hay un aumento de VEGF, HIF-1 $\alpha$ , bFGF y una disminución de angiostatina, esto puede ser indicativo de angiogénesis y un entorno tumoral en organización rápida y muy agresivo. A la inversa, una disminución en VEGF, HIF-1 $\alpha$ , bFGF y un aumento en angiostatina puede ser indicativo de una disminución en la angiogénesis y que un tratamiento dado es eficaz en el tratamiento del cáncer. El software de datos descrito anteriormente puede clasificar el aumento en la angiogénesis en una escala de desde 1 hasta 15.

Aunque el ensayo anterior se describe como uno que examina la expresión proteica, también puede construirse para incluir un ensayo para cada uno de los receptores para cada uno de los factores angiogénicos.

Los resultados obtenidos pueden utilizarse para sugerir un modo de tratamiento y, tras una visita de seguimiento y una toma de muestras adicional de una lesión sospechosa de crecimiento anómalo, el análisis puede utilizarse para confirmar la eficacia del tratamiento.

#### Sección de ensayo de inmunomodulación

Puede someterse a ensayo cualquier inmunomodulador como porción de inmunomodulación del sistema de ensayo de la presente descripción. En realizaciones, los componentes adecuados que pueden examinarse como parte de la porción de inmunomodulación del sistema de ensayo de la presente descripción incluyen:

5 1) TNF- $\alpha$

2) IL-6

10 Pueden obtenerse muestras tal como se describió anteriormente de una lesión sospechosa de crecimiento anómalo y tejido normal. Los niveles para muestras de una lesión sospechosa de crecimiento anómalo pueden compararse con los niveles basales de las muestras de tejido normal. Estos cálculos pueden evaluar el papel de la respuesta inmunitaria en la promoción del crecimiento tumoral. IL-6 aumenta con la edad y el estrés y puede tener un papel en la oncogénesis; tiene un papel bien establecido en la progresión del cáncer y su relación con la angiogénesis. Un aumento (regulación por incremento) de IL-6 puede promover la progresión tumoral. TNF- $\alpha$  puede promover o inhibir el crecimiento tumoral dependiendo del tipo de tumor maligno.

15 Los datos procesados mediante el software que acompaña al kit pueden utilizarse para evaluar el papel de la inflamación en el tipo de cáncer y, de manera más importante, en un paciente específico. Además de TNF- $\alpha$  e IL-6, también pueden cuantificarse las secreciones para los receptores de estas proteínas en las células. El valor final, en una escala de 1-15, en la que 1 significa la implicación más baja en la respuesta inmunomoduladora y 15 es la más alta, puede basarse en la expresión proteica así como en la actividad de receptores celulares.

Sección de ensayo del ciclo celular

25 La tasa de recambio de células cancerosas es extremadamente alta. Por tanto, con esta porción del sistema de ensayo, esta tasa de recambio puede cuantificarse midiendo marcadores del ciclo celular. Puede someterse a ensayo cualquier marcador del ciclo celular utilizando el sistema de la presente descripción. En realizaciones, los componentes adecuados que pueden examinarse como parte de la porción del ciclo celular del sistema de ensayo de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a:

30 1) p21

2) p27

35 De nuevo, muestras obtenidas mediante biopsia tal como se describió anteriormente se someterán a un ensayo ELISA tal como se describió anteriormente. Niveles disminuidos de cualquiera de los marcadores anteriores pueden indicar un aumento en el recambio celular que, a su vez, puede significar un tumor que crece agresivamente. En comparación con las biopsias de tejidos normales, la clasificación del recambio del ciclo celular puede clasificarse basándose en una escala de 1-15, en la que 1 es una tasa baja y 15 es la tasa de recambio más rápida. Los valores de esta porción del ensayo pueden proporcionar una indicación de la tasa de crecimiento de un tumor. Pueden examinarse muestras obtenidas en una visita de seguimiento para determinar la tasa de recambio celular, que entonces puede utilizarse para evaluar si un tumor está avanzando a una tasa rápida o si un tratamiento está deteniendo el crecimiento.

45 Sistema

50 Se expone un ejemplo de un informe de ensayo (para un paciente hipotético) que puede generarse con el software del sistema y kit de la presente descripción en las figuras 1-4 adjuntas y a continuación en las tablas 1-5. El informe de ensayo puede incluir información tal como el nombre del paciente, la fecha de nacimiento, un número de identificación, la fecha del informe, un breve resumen del historial del paciente, el diagnóstico que se sospecha, combinaciones de los mismos, y similares, así como cualquier otro factor considerado relevante para el profesional sanitario.

55 La figura 1 incluye un gráfico que representa el análisis de apoptosis de una muestra; la figura 2 incluye un gráfico que representa el análisis de angiogénesis de una muestra; la figura 3 incluye un gráfico que representa el análisis de inmunomodulación de una muestra; y la figura 4 incluye un gráfico que representa el análisis del ciclo celular de una muestra. Además de los gráficos representados en las figuras, el informe del ensayo (de nuevo, en este caso para un paciente hipotético) puede incluir la siguiente información incluida en las tablas 1-4 a continuación para cada ensayo (tabla 1 para el análisis de apoptosis, tabla 2 para el de angiogénesis, tabla 3 para el de inmunomodulación y tabla 4 para el del ciclo celular), con un resumen de muestras de los resultados del ensayo tal como se expone en la tabla 5 a continuación:

TABLA 1

65 Resultados de apoptosis:

Proteínas apoptóticas	Niveles en comparación con tejido normal
Bcl-2	Aumentados
Bax	Disminuidos
p53	Disminuidos
Bid	Disminuidos
Caspasa-3	Disminuidos
Citocromo C	Disminuidos

TABLA 2

Resultados de angiogénesis:

5

Proteínas de angiogénesis	Niveles en comparación con tejido normal
VEGF	Aumentados
Hif-1 $\alpha$	Aumentados
bFGF	Aumentados
Angiostatina-1	Disminuidos

TABLA 3

Resultados de inmunomodulación:

10

Proteínas de inmunomodulación	Niveles en comparación con tejido normal
TNF- $\alpha$	Aumentados
IL-6	Aumentados

TABLA 4

Resultados del ciclo celular:

15

Proteínas del ciclo celular	Niveles en comparación con tejido normal
p21	Disminuidos
p27	Disminuidos

TABLA 5

Resumen de resultados del ensayo

20

Sección de ensayo	Clasificación
Apoptosis	13
Angiogénesis	11
Inmunomodulación	9
Ciclo celular	11

Impresión clínica:

Los datos de los principales factores contribuyentes a la progresión y el estado de cáncer indican todos que el paciente tiene un tumor maligno agresivo que:

- 1) Presenta resistencia apoptótica significativa que puede presentar problemas hacia la intervención quimioterápica.
- 2) Aumento de la angiogénesis que está facilitando el suministro activo de nutrientes al microentorno tumoral y que forma armaduras vasculares dentro de y alrededor del tumor maligno para reforzar complejos extracelulares que se acoplan a sitios tumorales y posiblemente permiten la invasión metastásica a otros sitios de tejidos/órganos.
- 3) El tumor está creciendo a una tasa extremadamente alta. La tasa de recambio celular y multiplicación concuerda con un tumor que aumentará de tamaño rápidamente y/o invadirá tejido circundante, conduciendo posiblemente a metástasis basada en heterogeneidad.
- 4) Los factores inflamatorios están aumentados, lo que sugiere que el tumor

está en estado proliferativo y sano. El tumor está desarrollando "su propio sistema inmunitario", lo que añade otra capa de resistencia hacia una serie de modalidades de tratamiento y media en la comunicación dentro del microentorno tumoral.

5 Debe entenderse que el componente de software de la presente descripción puede implementarse en diversas formas de hardware, software, firmware, redes, procesadores de propósito especial o una combinación de los mismos. En realizaciones, la presente descripción puede implementarse en software como un programa de aplicación realizado de manera tangible en un dispositivo de almacenamiento de programas. El programa de aplicación puede subirse a, y ejecutarse por, un sistema informático que comprende cualquier arquitectura adecuada tal como un ordenador personal, una estación de trabajo o un servidor. En realizaciones, el sistema puede implementarse en una plataforma informática que tiene hardware tal como una o más unidades centrales de procesamiento (CPU) (por ejemplo, procesador), una memoria de acceso aleatorio (RAM), una memoria de sólo lectura (ROM) e interfaz/interfaces de entrada/salida (I/O) tal(es) como un teclado, un dispositivo de control de cursor (por ejemplo, un ratón o joystick) y un dispositivo de presentación visual. Puede utilizarse cualquier aparato de procesamiento de datos similar que pueda hacer funcionar el software descrito en el presente documento, generando de ese modo los datos descritos en el presente documento.

10  
15 En realizaciones, por ejemplo, un sistema adecuado puede incluir al menos un procesador acoplado a un medio legible por ordenador configurado para almacenar un conjunto de instrucciones que pueden ejecutarse por el al menos un procesador, incluyendo las instrucciones comparar un nivel de una proteína en una muestra de tejido con un valor de referencia, y determinar si la muestra de tejido es o no cancerosa. En tal caso, el conjunto de instrucciones que están ejecutándose por el al menos un procesador pueden incluir el componente de software indicado anteriormente.

20  
25 En otras realizaciones, los sistemas y kits pueden no incluir un ordenador, con la expectativa de que el usuario de un sistema o kit de la presente descripción posea una CPU o procesador/aparato similar en el que pueda ejecutarse el componente de software del sistema o kit, generando de ese modo los datos descritos en el presente documento.

30 Aún en otras realizaciones, un sistema y kit de la presente descripción puede incluir una unidad independiente que presenta un procesador con el software descrito en el presente documento y un lector que puede leer placas u otros medios/componentes utilizados en el ensayo de la presente descripción. Los ejemplos de tales sistemas incluyen, pero no se limitan a, los disponibles comercialmente como el sistema de ensayo biológico NANOCF™ de Eksigent Technologies (Dublin, CA).

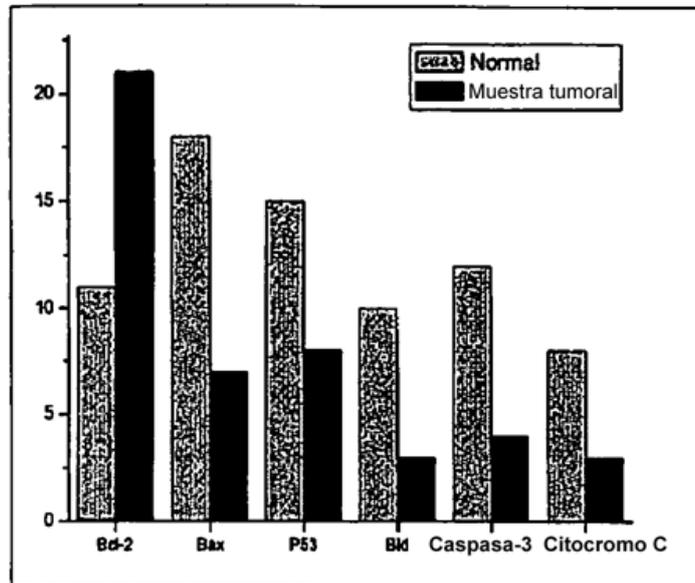
Se apreciará que diversas de las características y funciones dadas a conocer anteriormente y otras, o alternativas de las mismas, pueden combinarse deseablemente en muchos otros sistemas o aplicaciones diferentes.

**REIVINDICACIONES**

1. Método que comprende:
- 5 medir los niveles de proteínas implicadas en angiogénesis en una muestra de tejido obtenida de un animal, en el que las proteínas comprenden VEGF, HIF-1 $\alpha$ , angiostatina y bFGF ;
- comparar los niveles de las proteínas en la muestra de tejido con un valor de referencia;
- 10 en el que
- (A) un aumento en VEGF, un aumento en HIF-1 $\alpha$ , un aumento en bFGF y una disminución en angiostatina indica que la muestra es cancerosa; o
- 15 (B) una disminución en VEGF, una disminución en HIF-1 $\alpha$ , una disminución en bFGF y un aumento en angiostatina indica que un tratamiento es eficaz en tratar el cáncer en el animal.
2. Sistema para llevar a cabo el método según la reivindicación 1, que comprende al menos un procesador acoplado a un medio legible por ordenador configurado para almacenar un conjunto de instrucciones que pueden ejecutarse por el al menos un procesador, incluyendo las instrucciones:
- 20 comparar los niveles de proteínas en una muestra de tejido de un animal con un valor de referencia, en el que las proteínas comprenden VEGF, HIF-1 $\alpha$ , angiostatina y bFGF; y en el que
- 25 (A) un aumento en VEGF, un aumento en HIF-1 $\alpha$ , un aumento en bFGF y una disminución en angiostatina indica que la muestra es cancerosa; o
- (B) una disminución en VEGF, una disminución en HIF-1 $\alpha$ , una disminución en bFGF y un aumento en angiostatina indica que un tratamiento es eficaz en tratar el cáncer en el animal.
- 30 3. Sistema que comprende:
- ensayos para medir los niveles de proteínas implicadas en angiogénesis en una muestra de tejido, en el que las proteínas consisten VEGF, HIF-1 $\alpha$ , angiostatina y bFGF; y al menos un procesador acoplado a un
- 35 medio legible por ordenador configurado para almacenar un conjunto de instrucciones que pueden ejecutarse por el al menos un procesador, incluyendo las instrucciones las etapas de:
- comparar los niveles de las proteínas en la muestra de tejido con un valor de referencia, en el que
- 40 (A) un aumento en VEGF, un aumento en HIF-1 $\alpha$ , un aumento en bFGF y una disminución en angiostatina indica que la muestra es cancerosa; o
- (B) una disminución en VEGF, una disminución en HIF-1 $\alpha$ , una disminución en bFGF y un aumento en angiostatina indica que un tratamiento es eficaz en tratar el cáncer en el animal.
- 45 4. Método según la reivindicación 1, realización (A), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal de una región de tejido normal; o en el que el valor de referencia comprende un nivel conocido de las proteínas.
- 50 5. Sistema según la reivindicación 2 ó 3, realización (A), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal de una región de tejido normal; o en el que el valor de referencia comprende un nivel conocido de las proteínas.
- 55 6. Método según la reivindicación 1, realización (B), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal antes o durante el tratamiento del cáncer.
7. Sistema según la reivindicación 2 ó 3, realización (B), en el que el valor de referencia se obtiene de una muestra anterior obtenida del animal antes o durante el tratamiento del cáncer.

60

*Expresión de proteínas apoptóticas*



**Clasificación de apoptosis:**

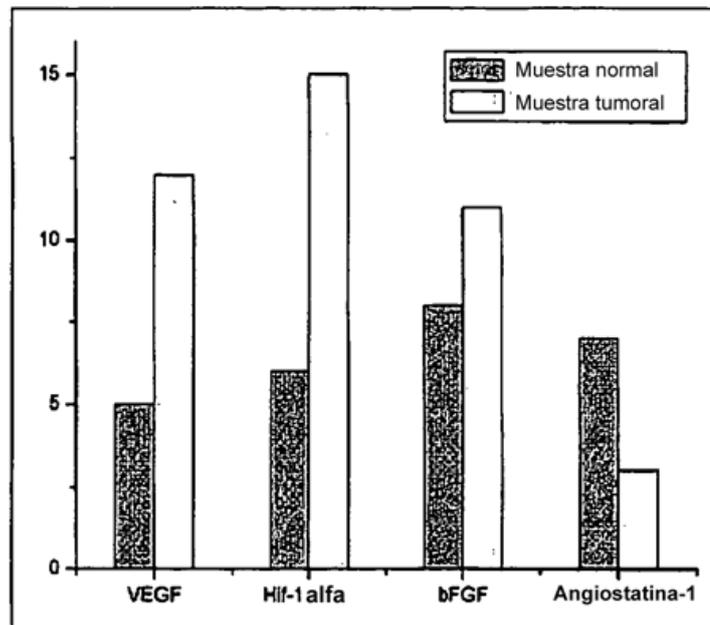
*Escala: 1 (baja resistencia apoptótica) - 15 (muy resistente a la apoptosis)*

**Muestra: 13**

**Resumen:** *La muestra muestra una alta resistencia a la apoptosis*

**FIGURA 1**

*Expresión de proteínas de angiogénesis*



**Clasificación de angiogénesis:**

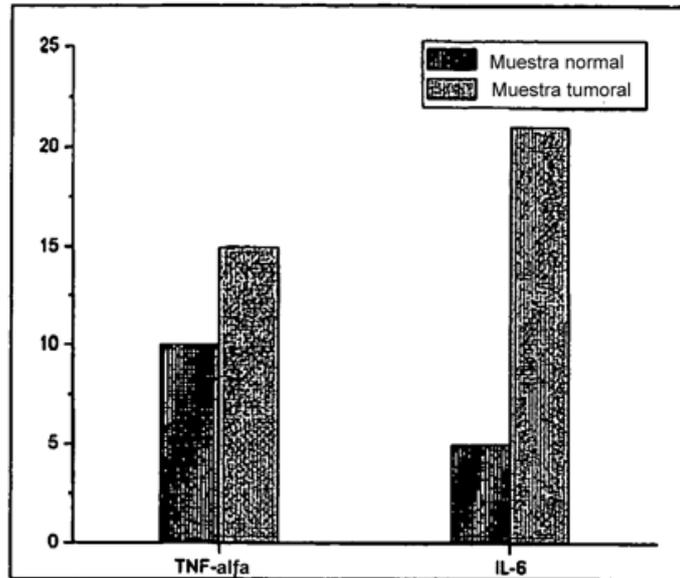
*Escala: 1 (baja tasa de angiogénesis) - 15 (alta tasa de angiogénesis)*

**Muestra: 11**

**Resumen:** *En comparación con tejido normal hay un aumento significativo en la angiogénesis*

**FIGURA 2**

*Expresión de proteínas inmunomoduladoras*



**Clasificación inmunomoduladora:**

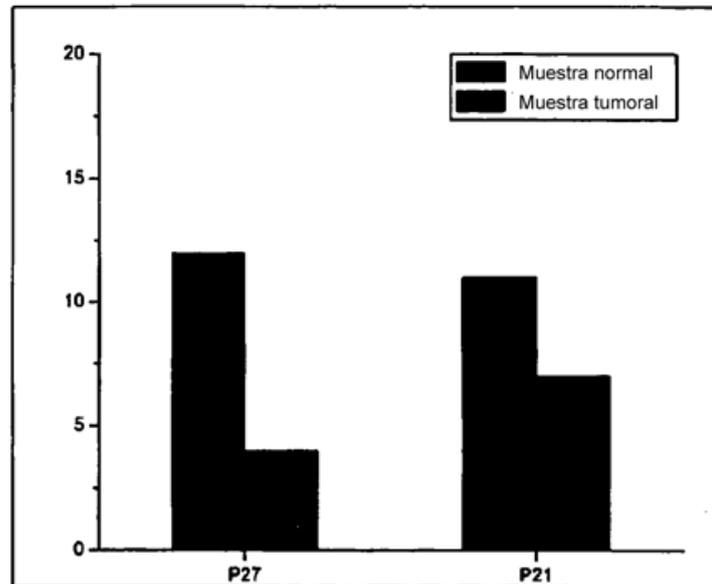
**Escala:** 1 (baja implicación de inmunomodulación en la progresión tumoral) -15 (los factores inmunomoduladores desempeñan un importante papel en la progresión tumoral)

**Muestra:** 9

**Resumen:** Hay una ligera influencia de factores inmunomoduladores en la progresión tumoral

**FIGURA 3**

*Expresión de proteínas del ciclo celular*



**Clasificación del ciclo celular:**

*Escala: 1 (alta inhibición por p21/p27) - 15 (baja inhibición por p21/p27)*

*Muestra: 11*

*Resumen: Hay una baja inhibición de la actividad del ciclo celular - multiplicación activa del cáncer*

**FIGURA 4**