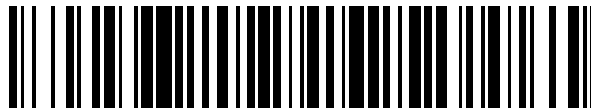


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 154**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2012 PCT/IL2012/050125**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12137207**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2012 E 12721945 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2694962**

54 Título: **Métodos de seguimiento y análisis de perfiles de actividad metabólica, usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

06.04.2011 US 201161472213 P

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

26.07.2017

73 Titular/es:

**RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (100.0%)
P.O. Box 39296
61392 Tel Aviv, IL**

72 Inventor/es:

**TIROSH, REUVEN;
PATOLSKY, FERNANDO y
PERETZ-SOROKA, HAGIT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 627 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos de seguimiento y análisis de perfiles de actividad metabólica, usos diagnósticos y terapéuticos de los mismos

5

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos de seguimiento y análisis de perfiles de actividad metabólica y usos diagnósticos de los mismos, o específicamente se refiere al diagnóstico del cáncer por seguimiento de la actividad metabólica de muestras de sangre.

10

Un problema importante en el tratamiento de la enfermedad sigue siendo la detección precoz y la estadificación. La detección precoz permite el tratamiento terapéutico desde la aparición de la enfermedad que en muchos casos resulta en un tratamiento exitoso. La estadificación de una enfermedad podría indicar acerca del protocolo apropiado de medicación que puede ser decisivo para el tratamiento óptimo. Por ejemplo, hoy día, millones de personas viven con cáncer o han padecido cáncer. El cáncer es la segunda causa más común de muerte en Estados Unidos, solo superada por las enfermedades del corazón. El cáncer representa casi 1 de cada 4 muertes en Estados Unidos. Cuanto antes se diagnostica y se trata un cáncer, mejores serán las posibilidades de supervivencia.

15

Todos los métodos conocidos para la detección del cáncer se centran en la identificación de la mayoría del tejido maligno y/o sus biomarcadores patológicos de cáncer secretados a la circulación. Sin embargo, estos métodos de diagnóstico por desgracia solamente son eficaces en etapas relativamente avanzadas de la enfermedad.

20

El efecto Warburg es la observación de que la mayoría de las células cancerosas producen predominantemente energía por una alta tasa de glicólisis seguido por la producción de ácido láctico en el citosol, en lugar de por una tasa relativamente baja de la glicólisis seguido por la oxidación de piruvato en la mitocondria, como la mayoría de las células normales [Kim JW, Dang CV (2006). "Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect". *Cancer Res.* 66 (18): 8927-30]. En segundo lugar, en 1920 Otto Warburg comprobó que las células del cáncer^{19,20}, en contraste con las células diferenciadas normales, principalmente dependen de la glicólisis aeróbica en lugar de la fosforilación oxidativa mitocondrial para generar ATP como combustible para la energía necesaria para los procesos celulares. Este fenómeno histórico se denominó "el efecto Warburg"²¹. Otto Warburg postula que este cambio en el metabolismo es la causa fundamental del cáncer [Warburg O (1956). "On the origin of cancer cells". *Science* 123 (3191): 309-14], una afirmación ahora conocida como hipótesis de Warburg. Cerca de 50 años más tarde el efecto Warburg también se observó en linfocitos activados in vitro, véase por ejemplo, Maclver et al. 2008 *J. Leukocyte Biology* 84: 1-9; y DeBerardinis *Cell Metabolism* 7: 11-20. Se comprobó que el efecto Warburg también se produce en el sistema inmunológico, donde las células T activadas^{22,23} hiperinducen rápidamente la glicólisis, por ejemplo por la sobre-expresión de los transportadores de glucosa (GLUT)²⁴.

25

30

35

El efecto Warburg tiene importantes aplicaciones médicas, puesto que la alta glucólisis aeróbica por tumores malignos se utiliza clínicamente para diagnosticar y controlar la respuesta al tratamiento de cánceres mediante la obtención de imágenes de captación de 2-¹⁸F-2-desoxiglucosa (FDG) (un sustrato radiactivo de la hexoquinasa modificada) con tomografía de emisión de positrones (PET). Véase también el documento WO2007/102146. Sin embargo, estos métodos son engorrosos y caros al requerir instalaciones de alta tecnología o biopsias de tejido in situ. Hynes et al. *Analytical Biochemistry* 390 (i): 21-28 enseña la medición de la actividad metabólica de las células cancerosas, incluyendo carcinoma hepatocelular, carcinoma colorrectal, neuroblastoma.

40

45

Por lo tanto, se necesitan métodos no invasivos para el diagnóstico precoz y simple.

50

Sumario de la invención

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para medir una actividad metabólica (AM) de una célula, comprendiendo el método medir de manera independiente en un entorno extracelular de la célula, los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

55

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles;
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

60

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además

en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependientes del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula.

65

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad asociada con una actividad metabólica modificada en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

5 medir de manera independiente en un entorno extracelular de una célula los perfiles de acidificación dependientes del tiempo de dicho sujeto debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- 10 (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además

15 en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependiente del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula y mientras que un cambio en la actividad metabólica en comparación con la de una muestra de células normales no afectadas examinadas en condiciones idénticas es indicativo de una enfermedad asociada con la actividad metabólica modificada.

20 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método para optimizar individualmente el tratamiento de la enfermedad, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto que comprende una célula con al menos un medicamento;
- 25 (b) medir de manera independiente en un ambiente extracelular de la célula los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- 30 (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además

35 en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependiente del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula y mientras que un cambio en la actividad metabólica de las células hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas es indicativo de un medicamento eficaz para la enfermedad.

40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de seguimiento del tratamiento de la enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método:

45 medir de manera independiente en un entorno extracelular de una célula de un sujeto tratado los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- 50 (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además

55 en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependiente del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula y mientras que un cambio en la actividad metabólica de las células hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas es indicativo de un tratamiento eficaz de la enfermedad.

60 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un método de identificación de un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células, comprendiendo el método:

- (a) someter las células a un agente;
- (b) medir la actividad metabólica de las células después de (a) y opcionalmente antes de (a) de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en el que un cambio en los perfiles de acidificación es indicativo de un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células.
- 65

- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el medio extracelular comprende una solución definida que tiene una capacidad tamponante calibrada.
De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el tampón comprende una solución salina tamponada con fosfato.
- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula comprende un leucocito.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una célula cancerosa.
- 10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las células comprenden una célula mononuclear de sangre periférica (CMSP).
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la enfermedad comprende cáncer.
- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la muestra biológica comprende una muestra de sangre.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en cáncer, infección patógena y una enfermedad autoinmune.
- 20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los metabolitos no volátiles comprenden lactato.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los metabolitos volátiles comprenden NH_3 y CO_2 .
- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la medición del perfil de acidificación de (i) se efectúa en cámaras expuestas al aire.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la medición del perfil de acidificación de (ii) se realiza en cámaras selladas al aire.
- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la medición de los perfiles de acidificación se efectúa a una temperatura constante.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la temperatura constante comprende 37 °C.
- 35 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método además comprende someter a la célula a un estimulante o inhibidor antes de, o simultáneamente con la medición del perfil de acidificación.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el estimulante o inhibidor comprende una célula.
- 40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el estimulante o inhibidor comprende un antígeno libre de células.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la célula estimulante comprende linfocitos y la célula comprende un linfocito no singénico con respecto al linfocito.
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la medición de los perfiles de acidificación se efectúa en un escáner de placa de fluorescencia de múltiples pocillos comercial.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el filtrado de la señal a ruido de las medidas de fondo del ensayo de AM se lleva a cabo por análisis de agrupamiento de medios k.
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, las decisiones de diagnóstico por las medidas de la actividad metabólica están sujetas a al menos dos modelos de árboles de decisión.
- 55 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los modelos de árboles de decisión se seleccionan del grupo de C5, C&R Tree y CHAID.
- De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el método comprende además la separación de la célula del entorno extracelular.
- 60 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la separación es mediante separación Ficoll bajo centrifugación.
- 65 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o ensayo de realizaciones de la invención se pueden utilizar métodos y materiales

similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen métodos y/o materiales ejemplares. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

5

Breve descripción de los dibujos

Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Ahora, con referencia específica a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica formas de realización de la invención.

10

En los dibujos:

15

La FIG. 1 es una representación esquemática de las diferencias entre la fosforilación oxidativa, la glicólisis anaeróbica, y la glicólisis aeróbica (también conocido como "efecto Warburg").

La FIG. 2 es un gráfico que muestra los espectros de absorción dependiente del pH del ácido 8-hidroxi-pireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS).

20

Las Fig. 3A-D son gráficos que muestran el pH y la calibración de la acidez de la solución de trabajo a 2 mM y solución salina de tampón fosfato 10 mM, a HPTS 1 μ M. ABIERTO: Los pasos de acidificación se controlaron a 37 °C sin sello. CERRADO: Los pasos de acidificación se controlaron a 37 °C después de que se selló la placa de múltiples pocillos.

25

eje X; la relación: (intensidad de fluorescencia a Ex. 403 nm)/(intensidad de fluorescencia a Ex. 455 nm).

eje Y de la derecha (triángulos): La cantidad acumulada de HCl (μ mol/ml) tal como se obtiene mediante la adición secuencial de HCl 1N.

eje Y de la izquierda (círculos): los valores de pH apropiados según lo medido por el electrodo de vidrio de pH. Figuras 3A-B - Solución de trabajo con solución salina de tampón fosfato 2 mM. Figuras 3C-D - Solución de trabajo con solución salina de tampón fosfato 10 mM.

30

Las Fig. 4A-B son gráficos que muestran curvas de calibración a concentraciones HPTS de 1 μ M y 10 μ M en solución salina de tampón fosfato 10 mM.

35

eje X: la relación: (intensidad de fluorescencia a Ex. 455 nm)/(intensidad de fluorescencia a Ex. 403 nm)

eje Y de la derecha (triángulos): La cantidad acumulada de HCl (μ mol/ml) tal como se obtiene mediante la adición secuencial de HCl 1N.

eje Y de la izquierda (círculos): los valores de pH apropiados según lo medido por el electrodo de vidrio de pH. (Figura 4A) La concentración final de HPTS es 1 μ M. (Figura 4B) La concentración final de HPTS es 10 μ M.

40

Las Fig. 5A-D muestra el análisis de agrupamiento de medias k de los valores de la tasa de referencia HPTS. Las Figuras 5A-C – el punto del eje x sobre valores normalizados de la sonda recibidos de "ABIERTO", y el punto del eje y sobre valores normalizados de la sonda recibida de mediciones "CERRADO". Figura 5A - Examen de todos los valores de todos los donantes de prueba (N = 730 observaciones) antes del análisis de agrupamiento. Figura 5B- el análisis de agrupamiento de medias k de los datos de la sonda se indica en 26 grupos presentados con diferentes colores. Cinco grupos se encontraron pequeños (observaciones \leq 6) y por lo tanto se descartaron (valores atípicos). Figuras 5C-D - se excluyeron 34 observaciones (4,66 %) de 730 observaciones (rojo). Las 696 observaciones restantes (95,34 %) (azul) se presentan en 21 grupos separados en (Figura 5B). A continuación, se volvieron a calcular para cada donante los valores medios de los estados "ABIERTO" y los valores medios de los estados "CERRADO".

45

50

Las Fig. 6A-C son perfiles de AM para el aumento de la concentración de glucosa obtenido para donantes sanos típicos y donantes con cáncer. eje x: Concentración de glucosa (mM). eje y: tasa de actividad metabólica de CMSPh en unidades de picomol H^+ / μ l/hora/CMSPh 2500 para las figuras 6B-C y picomol H^+ / μ l/hora para la Figura 6C. La cinética de acidificación se mide durante 1 hora de incubación a 37 °C. Ciclo de estado "ABIERTO" de la placa de múltiples pocillos durante 30 minutos. En este estado existe una ventilación de gas de CO_2 y NH_3 , de modo que solo la producción de ácido láctico (incluyendo otros ácidos orgánicos no volátiles) contribuye a la acumulación de ácido equivalente en cada pocillo. Ciclo de estado "CERRADO" de la misma placa de múltiples pocillos durante 30 minutos. En este estado herméticamente sellado, el CO_2 y el NH_3 reaccionan en equilibrio con agua para formar iones de ácido carbónico y de amonio. El nivel de acidez se produce tanto por los aniones de ácido láctico como de ácido carbónico alrededor de pH 7,3. El catión básico NH_4^+ se evalúa en el presente documento para valorar el nivel de acidez. "CERRADO" - "ABIERTO" = $CO_2 + (-NH_3)$. (Figura 6A) Un registro de control del ensayo de AM incluyendo los HPTS sonda y glucosa, pero sin células. (Figura 6B) perfiles de AM de una mujer de 45 años de edad que representa un donante sano típico (se obtienen perfiles similares para diferentes edades y sexo). (Figura 6C) perfiles de MA de una mujer de 37 años con cáncer de mama idc en fase

55

60

65

2 y antes del tratamiento. Obsérvense que pueden detectarse cambios inducidos por la AM entre las muestras sanas y enfermas ya en estado basal (muestra de control sin estimulantes).

Las Fig. 7A-D son gráficos que muestran un caso de estudio de seguimiento de los perfiles de AM para aumentar la glucosa obtenida para una mujer de 65 años de edad con cáncer de mama comparado con un varón de 69 años sano. Negro - "CERRADO"; Rojo - "ABIERTO"; Azul - "C-A" = "CERRADO" - "ABIERTO". Las figuras 7A - perfiles de AM de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de un varón de 69 años sano. Las figuras 7B-D3 muestran los perfiles de seguimiento de la AM de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de una mujer de 65 años de edad con cáncer de mama idc. Eje x: concentración de glucosa (mM). Eje y: tasa de actividad metabólica de CMSP en unidades de picomol H^+ /μl/hora/CMSP 2500. (Figura 7B) El primer ensayo de AM del seguimiento de los pacientes, ya sospechoso por los resultados del ensayo de padecer cáncer (tiempo = 0). (Figura 7C) Tiempo = + 10,5 meses- El segundo ensayo de AM justo después de la mamografía de rutina diagnosticada por los médicos de padecer cáncer de mama idc en fase 3. (Figura 7D) Tiempo = + 14,5 meses - El sexto ensayo de AM se llevó a cabo después de la extirpación quirúrgica del tumor de 2,2 x 2,4 cm en el pecho izquierdo y después de 2 meses de 3 tratamientos de quimioterapia.

Las Fig. 8A-D son gráficos que muestran los perfiles de AM para aumentar la concentración de PSA obtenido para donantes sanos típicos, paciente de cáncer de mama y donante recuperado de cáncer de mama.

Figura 8A - un registro de control del ensayo de AM incluyendo los HPTS sonda y PSA, pero sin células (Figuras 8B-D) Perfiles de AM de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 3 donantes diferentes. Eje x: concentración de PSA (μg/ml). Eje y: tasa de actividad metabólica de CMSP en unidades de picomol H^+ /μl/hora/CMSP 2500 para las Figuras 9B-D y picomol H^+ /μl/hora para la Figura 8A. La cinética de acidificación se mide durante 1 hora de incubación a 37 °C. Negro - "CERRADO"; Rojo - "ABIERTO"; Azul "C-O" = "CERRADO" - "ABIERTO". (Figura 8A) perfiles de AM de una mujer de 59 años de edad, que representa un donante sano típico. (Figura 8B) perfiles de MA de una mujer de 37 años con cáncer de mama idc en fase 2 y antes de cualquier tratamiento. (Figura 8C) perfiles de AM de una mujer de 50 años recuperada de cáncer de mama 18 años antes del ensayo de AM.

Las Fig. 9A-D muestra la construcción de modelos y la evaluación de la clasificación de los resultados de los ensayos de AM.

Las Figuras 9A-B - Primer grupo de donantes con edad por encima de 40 (n = 42). Las figuras 9C-D - Segundo grupo de donantes con edad entre 22 y 81 años de edad. Figuras 9A, C - Las dos tablas presentan los mejores modelos con el mejor punto de corte de la mejor clasificación. "O" se refiere al estado "ABIERTO", "C" se refiere a estado "CERRADO" y "C-O" se refiere al estado "CERRADO - ABIERTO". TP se refiere a verdadero positivo, FN se refiere a falso negativo, TN se refiere a verdadero negativo y FP se refiere a falso positivo. Figuras 9B, D- dos gráficas para la evaluación y comparación de los resultados de los modelos de las tablas de ganancia acumulada. El eje y muestra el porcentaje de donantes clasificados por los modelos de padecer cáncer. Este es un porcentaje de los donantes totales (pacientes sanos y cáncer). El eje x muestra el porcentaje de pacientes clasificados de padecer cáncer, que es una fracción de los 42 donantes totales para el primer grupo y 67 donantes totales para el segundo grupo. Se presentan los 4 mejores modelos que eran capaces de clasificar con gran precisión tanto en donantes sanos como en pacientes con cáncer. El cuarto modelo es un modelo de regresión logística de la familia de modelos de regresión. La línea negra se refiere a la tasa de respuesta al azar (si se clasifican al azar X% de los donantes, se obtienen X% de pacientes con cáncer). La línea azul cielo se refiere al mejor modelo teórico. La línea roja se refiere al modelo CHAID, la línea verde se refiere a algoritmo C5, la línea amarilla se refiere al modelo de árbol C & R y la línea azul se refiere al modelo logístico.

Las Fig. 10A-D presentan los resultados del modelo de evaluación del ensayo de AM usando un conjunto de validación del 30 % de los donantes. Las Figuras 10A-B - Primer grupo de donantes con edad por encima de 40 (n = 42). Figuras 10C, D - Segundo grupo de donantes con edad de 22 a 81 años de edad. (a, c) Los datos como se describen en la figura 9 se dividieron al azar en dos grupos de "Formación" y "Ensayo" utilizando el software Clementine v13.0. Figura 10A - el conjunto de validación incluye el 70 % de los donantes para el primer grupo. Figura 10C - el conjunto de validación incluye el 70 % de los donantes para el segundo grupo. Figuras 10A, C - Dos gráficos para la evaluación y comparación del rendimiento de los modelos realizados por las ganancias de los gráficos acumulados después del reparto de datos al azar. El eje y muestra el porcentaje de donantes clasificados por los modelos de padecer cáncer. Este es un porcentaje de los donantes totales (pacientes sanos y con cáncer). El eje x muestra el porcentaje de pacientes clasificados de padecer cáncer. El conjunto "Formación" se utiliza para construir el modelo de minería de datos sobre el 70 % de los donantes. El 30 % restante de los donantes se utiliza más tarde para evaluar el resultado de la clasificación en el conjunto de "Ensayo" usando los modelos que se generaron en el conjunto de formación (CHAID, Logistic, C5, C & R Tree). Como se describe en la figura 9, la línea azul cielo se refiere al mejor modelo teórico, la línea roja al modelo CHAID, la línea verde al algoritmo C5, la línea amarilla al modelo de árbol C & R, la línea azul al modelo logístico y la línea de color negro se refiere al modelo aleatorio. Figuras 10B, D - Las dos tablas presentan el mejor modelo con el mejor punto de corte de la mejor clasificación después del reparto de datos aleatorios. "O" se refiere al estado "ABIERTO", "C" se refiere a estado "CERRADO" y "C-O" se refiere al estado "CERRADO - ABIERTO". TP se refiere a verdadero positivo, FN se refiere a falso negativo, TN se refiere a verdadero negativo y FP se refiere a falso positivo. En ambos grupos de donantes C5 fue el de mejor rendimiento en el conjunto de "Ensayo" mientras que en el conjunto de "Formación" C&RT fue el que mejor se comportó.

La FIG. 11 representa una hipótesis de trabajo: perfiles de actividad metabólica de CMSP como imagen especular del desarrollo de tumores. El desarrollo del cáncer se considera que está asociado con cambios en la función fisiológica del sistema inmunológico que podrían reflejarse en diferentes perfiles de actividad metabólica

(AM) de las CMSPh. El eje y presenta los dos brazos de las vías metabólicas, en concreto, la fosforilación oxidativa frente a la glicólisis aerobia. El eje x presenta las etapas del desarrollo de tumores desde sano a metástasis del cáncer. Las células quiescentes (Q) tienen una tasa basal dominante de la fosforilación oxidativa. En etapas iniciales del desarrollo del tumor hay "expansión clonal" del subgrupo específico de tejido relevante Q (Qi) en células asesinas efectoras antitumorales (Eki), que en etapas posteriores probablemente se transforman en células alimentadoras efectoras del protumor (Efi). Al mismo tiempo, la tolerancia inmune y la anergia sucumben en la etapa de metástasis, donde ambos subgrupos específicos de tejido se pueden agotar, incluyendo su respectivo subgrupo quiescente (Qi). Los presentes resultados revelan un cambio metabólico de la fosforilación oxidativa dominante preferido por CMSPh de donantes sanos a la glicólisis aeróbica dominante ("Efecto Warburg") preferido por CMSPh de varios pacientes con cáncer en las fases de desarrollo local del tumor (fases 1-3). El cambio hacia la glicólisis aeróbica puede estar relacionada con un subgrupo dominante Efi y posiblemente también con el subgrupo Eki. La capacidad de detección precoz específica de tejido del cáncer (etapa 0) se examinará por un protocolo de seguimiento. Se espera que se revele como una activación metabólica mejorada/reducida bajo estimulación por tejido - antígenos específicos, en comparación con la obtenida para donantes sanos. En cáncer en metástasis temprana (fase 4) se espera desplazamiento gradual hacia atrás hacia la fosforilación oxidativa dominante, produciendo una herramienta de diagnóstico para el tratamiento adecuado. La descripción esquemática anterior de los perfiles de actividad metabólica característicos se presenta con la línea de rayas de color naranja que se relaciona con la diferencia de los resultados "cerrado - abierto" del ensayo de AM, que indican el cambio del efecto Warburg de las CMSPh.

La FIG. 12 es un diagrama de flujo del marco del protocolo y análisis del ensayo de AM. Las fases secuenciales A-E del marco del ensayo de AM encajan con las que se detallan en el Ejemplo 1 de la sección de ejemplos que sigue.

Fig. 13A-I. Perfiles de AM para aumentar la concentración de glucosa obtenida por un donante típico saludable, con cáncer y con lupus autoinmune. Eje x: concentración de glucosa (mM). Eje y: tasa de actividad metabólica de PBMC en unidades de $\text{pico mol H}^+/\mu\text{l/hora}/2500$ células. La cinética de acidificación se mide durante 1 hora de incubación a 37 °C.

Figuras 13A, D, G - "CERRADO"; 13B, E, H - "ABIERTO"; 13C, F, I - "C-O" = "CERRADO" - "ABIERTO". Figuras 13A-C - Perfiles de AM representativos de un donante sano típico. Figuras 13D-F - Perfiles de AM representativos de un paciente típico con cáncer. Figuras 13G-I - Perfiles de AM de un paciente con lupus sistémico (una enfermedad autoinmune).

Descripción de las realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a métodos de seguimiento y análisis de perfiles de actividad metabólica y usos diagnósticos de los mismos, o específicamente se refiere al diagnóstico del cáncer por seguimiento de la actividad metabólica de muestras de sangre.

Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención permite otras realizaciones o que se pueda poner en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras.

Hoy en día, urgentemente se requieren métodos de alto rendimiento para la detección precoz y la estadificación de diversas enfermedades. Por ejemplo, cuanto antes se detecta y se trata un cáncer, mejores serán las posibilidades de supervivencia. Además la identificación de la fase de la enfermedad asegura el tratamiento adecuado.

Los presentes inventores se han dado cuenta de que, en contraste con los enfoques convencionales para la detección de enfermedades que analizan diferentes parámetros in situ o marcadores circulatorios relevantes asociados con la enfermedad que permiten la detección de enfermedades en etapas relativamente tardías, el sistema inmunológico podría reflejar el estado de enfermedad ya en el inicio de la enfermedad. Dado que el sistema inmunológico es responsable de combatir de forma natural el desarrollo de la enfermedad ya en las primeras etapas, sería beneficioso identificar los perfiles característicos de las respuestas inmunes relevantes. La variación de dichos perfiles de actividad metabólica del sistema inmunológico junto con el desarrollo de la enfermedad también puede ser útil para la estadificación de la enfermedad. Por ejemplo, en homeostasis, la actividad del sistema inmunológico debe estar bien controlada; la hiperactividad se asocia con enfermedades autoinmunes, mientras que el desarrollo del cáncer probablemente está relacionado con la hipoactividad del sistema inmunológico. Estas rutas opuestas pueden estar indicadas por perfiles de AM generales y más específicos en respuesta a diversos nutrientes y estimulantes.

Así, los presentes inventores han ideado un enfoque innovador, orientado clínicamente a la medición cuantitativa de la actividad metabólica de poblaciones de células relevantes, como indicador de enfermedad. El ensayo mide la tasa de la actividad metabólica de microlitros de muestras celulares, mediante el seguimiento de la acidificación extracelular usando una sonda de fluorescencia impermeable sensible al pH.

Como se ilustra en la sección de ejemplos que sigue, utilizando el análisis de la actividad metabólica (AM), los presentes inventores han puesto de manifiesto un cambio significativo entre las diferentes vías metabólicas

- controladas en CMSP obtenidas de pacientes con cáncer y donantes sanos. Este cambio se puede adoptar como herramienta de diagnóstico, para una diferenciación clara entre los pacientes sanos y con cáncer mediante la supervisión de los cambios característicos en la actividad metabólica de CMSP (Figuras 6-10, 13). Estos hallazgos preliminares significativos se obtuvieron comparando los resultados del ensayo de AM en pocillos “abiertos” frente a pocillos “cerrados” (sellados al aire). Ambos registros permiten medir las acumulaciones de productos metabólicos solubles frente a volátiles (ácido láctico frente a CO_2 y NH_3), diferenciando de esta manera entre tres vías metabólicas - la fosforilación oxidativa, la glicólisis anaeróbica y la glicólisis aeróbica, tal como se interpreta a continuación.
- Las células T no activas (células T naive), como la mayoría de las células diferenciadas normales, dependen principalmente de la fosforilación oxidativa mitocondrial para generar ATP eficientemente para la energía necesaria para los procesos celulares, y el producto CO_2 volátil. En ausencia de oxígeno deben depender de una vía metabólica mucho menos eficientes de producción de ATP, asociada a la producción de ácido láctico, conocida como glicólisis anaeróbica. En contraste, la mayoría de las células cancerosas¹⁸ se encuentra que dependen de la glicólisis aeróbica, que es similar a la glicólisis anaeróbica a pesar de la presencia de oxígeno. Este fenómeno fue encontrado originalmente por Otto Warburg en relación con las células cancerosas, y se denominó “efecto Warburg”. Los presentes inventores revelaron la presencia del “efecto Warburg” en CMSP frescas de pacientes con cáncer. Sin estar ligado por la teoría, la explicación inmunometabólica del “efecto Warburg”, es decir, el cambio entre los linfocitos naive y activados en CMSP frescas de pacientes con cáncer, puede estar relacionado con la necesidad de la función fisiológica agresiva y eficaz de las células T activadas en las proximidades de las células tumorales, en las que en las etapas tempranas antes de la angiogénesis es probable que sea deficiente en oxígeno. Esta idea es coherente con el hecho de que las células tumorales inicialmente están adaptadas a la deficiencia de oxígeno a través del “efecto Warburg”.
- A la luz de las vías metabólicas anteriores, los productos finales, el CO_2 y el lactato contribuyen directamente a la acidificación examinada por el ensayo de AM.
- Además, otro producto final que se considera que desempeña un papel importante en el ensayo de AM es el amoníaco (NH_3). Una de las fuentes primarias de energía de la célula es el catabolismo de proteínas, que es el proceso de descomposición de proteínas en aminoácidos. Los grupos amino se eliminan de los aminoácidos y se convierten en amoníaco. Otra fuente de producción de NH_3 celular es a través de vías metabólicas de las purinas y pirimidinas que constituyen los dos grupos de bases nitrogenadas. En el presente sistema de medición, como en células vitales in vivo, deben mantener el citoplasma a un pH constante de aproximadamente 7,2 a 7,4 por la secreción de productos metabólicos ácidos y básicos, tales como el ácido láctico, los ácidos carbónicos y la base de amonio.
- Estos hallazgos ya aseguran que mediante la comunicación con el sistema inmunológico el análisis de AM orientado fisiológicamente podría tener implicaciones significativas para el desarrollo de nuevas formas para detectar, diagnosticar y tratar el cáncer, así como otras enfermedades.
- Por lo tanto, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para medir una actividad metabólica (AM) de una célula. El método comprende medir de manera independiente (es decir, por separado) en un entorno extracelular de la célula, los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:
- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
 - (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles;
 - (iii) productos metabólicos solubles volátiles;
- en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependientes del tiempo es indicativo de la vía de la actividad metabólica de las células.
- Tal como se usa en el presente documento “vía de la actividad metabólica” se refiere a la contribución relativa de la fosforilación mitocondrial oxidativa, la glicólisis anaeróbica, la glicólisis aeróbica y la producción de NH_3 para la producción de energía.
- Los perfiles pueden tener una configuración en pico o un comportamiento monotónico saturado. Un perfil en pico normalmente refleja la estimulación mediada por receptor de la actividad metabólica que se espera que sea más específica en comparación con la respuesta dependiente de la concentración de nutrientes. Esta última respuesta generalmente es un perfil monotónico saturado.
- Tal como se usa en el presente documento “célula” se refiere a una célula procariota o eucariota para la que se puede medir la actividad metabólica anterior. La célula puede ser una célula de bacteria, levadura, planta, insecto o

5 mamífero. De acuerdo con una realización específica, la célula es una célula humana. Se apreciará que la célula puede referirse a una sola célula, pero también puede referirse a una pluralidad de células. Las células pueden ser células aisladas (que no tienen la organización del tejido) o células en un tejido o fragmento de tejido. De acuerdo con una realización específica, cuando las células son CMSP, el ensayo se realiza sobre 10^3 - 10^{10} células. De acuerdo con una realización específica el número de células es de 10^6 - 10^7 .

La célula puede ser una célula diferenciada, una célula no diferenciada o una célula desdiferenciada (por ejemplo, células madre).

10 De acuerdo con una realización específica, la célula es una célula del sistema inmunológico, que es un glóbulo blanco (es decir, un leucocito). Los ejemplos incluyen, un neutrófilo, un eosinófilo, un basófilo, un linfocito (célula T o célula B), un monocito, un macrófago y una célula dendrítica.

15 De acuerdo con otra realización, la célula es una célula patógena o enferma de cualquier tejido, tal como una célula cancerosa. De acuerdo con las presentes enseñanzas que se proporcionan a continuación se pueden detectar otras enfermedades y afecciones médicas.

20 Otras células que pueden analizarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, una célula embrionaria (por ejemplo, para la calificación IVF), un glóbulo rojo, una plaqueta, una célula bacteriana infectada, una célula infectada por un hongo, y una célula infectada por un virus.

25 Por lo tanto, la célula puede referirse a una población aislada de células que comprenden un subconjunto altamente purificado de células específicas, es decir, una población de células homogénea (por ejemplo, > 80 % de pureza), por ejemplo, células T, o una población celular heterogénea que comprende varios tipos de células inmunológicas tales como leucocitos de sangre periférica (PBL) o células mononucleares.

Las células pueden ser no cultivadas, células primarias cultivadas o células clonadas (por ejemplo, líneas de células).

30 Las células pueden ser células adherentes o células en suspensión.

De acuerdo con otras realizaciones, las células pueden estar modificadas o no modificadas genéticamente.

35 Tal como se usa en el presente documento "medir de manera independiente" se refiere a separar la medición de los puntos (i), (ii) y posiblemente (iii). Aunque de acuerdo con una realización específica se apreciará que (iii) es el resultado de restar (i) de (ii). Estas mediciones separadas se pueden realizar en paralelo, simultáneamente, en muestras de células idénticas aún no separadas, o secuencialmente en una sola muestra de células (como se describe en la sección de ejemplos que sigue).

40 Por lo tanto, la medición del perfil de acidificación extracelular se lleva a cabo por la curva de acidificación calibrada (Tabla 1).

45 La medición de la actividad metabólica se lleva a cabo mediante el cálculo de la acidificación acumulada en relación con los cambios del pH medidos por fluorescencia en el medio extracelular de las células (por ejemplo, pmol/μl/hora/2500 células) en el estado "abierto" y "cerrado". Se apreciará que, de acuerdo con una realización específica, esta medición se lleva a cabo solo en el entorno extracelular de la célula y no intracelularmente. La medición del pH extracelular es ventajosa ya que en el entorno extracelular hay una acumulación de ácido persistente frente a unos cambios promedio relativamente pequeños en las respuestas intracelulares transitorias debido a la regulación fisiológica homeostática; no hay interferencia fisiológica de la sonda extracelular con los procesos intracelulares; hay una relación comparativa alta de señal a ruido de la sonda fluorescente radiométrica extracelular; simplicidad de la preparación del medio fluorescente (capacidad tamponante calibrada) frente a manipulaciones celulares; no hay fluorescencia de fondo en contraste con una fuga significativa en sondas intracelulares; las mediciones cinéticas se realizan sin necesidad de procedimientos de permeabilización, permitiendo de este modo el análisis de células vivas, en tiempo real; hay un mínimo de problemas asociados con los efectos de inactivación y oxidación; y finalmente se permiten mediciones cinéticas simultáneas de alto rendimiento sin los obstáculos anteriores.

60 Tal como se usa en el presente documento "un entorno extracelular" de la célula se refiere a un medio ambiente natural, por ejemplo, sangre o plasma, o un entorno artificial tal como un medio de cultivo.

De acuerdo con una realización específica, el ensayo de AM se efectúa en una solución definida (se conocen todos los componentes) que tiene una capacidad tamponante calibrada.

65 Se apreciará que la capacidad tamponante debe garantizar cambios menores en el pH fisiológico.

De acuerdo con una realización específica, el tampón es un tampón fosfato (por ejemplo, tampón fosfato salino 1-10 mM o tampón fosfato 10 mM). Se apreciará que se requiere una baja concentración de tampón para las mediciones de acidificación a la baja concentración celular. De acuerdo con una forma de realización se utiliza una solución salina específica de tampón fosfato 10 mM para $2,5 \times 10^6$ células/ml.

5 Por lo tanto, la cinética de la actividad metabólica se controla durante la incubación por un proceso de acidificación menor de una capacidad tamponante de HPTS calibrada por fluorescencia.

Las Figuras 3A-D y 4A-D describen la calibración de la solución de trabajo y la calibración de la sonda, respectivamente.

10 De acuerdo con una realización específica, la medición de los perfiles de acidificación se realiza a una temperatura constante, por ejemplo, 20-40 °C o específicamente, a la temperatura óptima de crecimiento, digamos 37 °C para las células de mamíferos.

15 Como se ha descrito anteriormente en este documento, los perfiles de acidificación extracelular son indicativos de la identidad de los diversos productos metabólicos secretados por la célula.

20 Como se muestra en Figuras 1, un tumor o tejido proliferativo (por ejemplo, células T activadas) utiliza preferentemente la glicólisis aeróbica que se caracteriza principalmente por la secreción de lactato al medio. En contraste, un tejido diferenciado empleará la fosforilación oxidativa o la glicólisis anaeróbica y por lo tanto secretará CO₂ o lactato, dependiendo de la disponibilidad de oxígeno, respectivamente.

25 De acuerdo con una realización específica, el perfil de acidificación dependiente del tiempo debido a la secreción de productos metabólicos solubles no volátiles, principalmente lactato, se lleva a cabo en una cámara expuesta al aire. Bajo tales condiciones (“abierto”), existe una ventilación de gas de CO₂ y NH₃, de modo que solo la producción de lactato ácido (incluyendo otros ácidos orgánicos no volátiles) contribuye a la acumulación de ácido equivalente en cada pocillo.

30 De acuerdo con una realización específica, el perfil de acidificación dependiente del tiempo debido a la secreción de productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles se efectúa en una cámara sellada al aire. En el estado herméticamente sellado (“cerrado”), el CO₂ y el NH₃ reaccionan en equilibrio con el agua para formar ácido carbónico e iones básicos de amonio. En este estado, sin embargo, el catión básico NH₄⁺ titula el nivel de acidez producida tanto por los aniones de ácido láctico como de ácido carbónico alrededor de pH 7.

35 De acuerdo con una realización específica, la cinética de acidificación se mide en una secuencia de 30 minutos estados “abiertos” y “cerrados” al aire de la placa de múltiples pocillos.

40 Por las tasas apropiadas (V), de la acidificación (+) y valoración básica (-), las tasas medidas totales de la acidificación en estado abierto (Vabierto) y en estado cerrado (Vcerrado) se describen por las ecuaciones acopladas:

$$V_{abierto} = V(\text{ácido láctico}).$$

$$V_{cerrado} = V(\text{ácido láctico}) + V(\text{ácido carbónico}) - V(\text{base de amonio}).$$

45 Usando esta configuración, se calcula el perfil de acidificación dependiente del tiempo debido a la secreción de productos metabólicos solubles volátiles mediante la sustracción de los perfiles de (ii) - (i).

50 La medición de la cinética de acidificación extracelular se realiza utilizando una sonda impermeable a la membrana no tóxica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una sonda radiométrica de pH, una sonda de CO₂, una sonda de NH₃, una sonda de lactato y una combinación de las mismas. De acuerdo con una realización específica se requiere la técnica radiométrica para una alta sensibilidad en condiciones de pH tamponado.

55 Los ejemplos de sondas específicas que se pueden utilizar de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, HPTS, CFDA y carboxi fluoresceína. Dichas sondas están disponibles en el mercado, tal como en Molecular Probes.

De acuerdo con una realización específica, la medición de la acidificación se efectúa usando la sonda radiométrica de pH de ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS).

60 El HPTS es un indicador de pH impermeable a la membrana, rentable, no tóxico, y altamente soluble en agua con un pKa de ~7,3 en tampones acuosos. El HPTS presenta un cambio de absorción dependiente del pH, lo que permite mediciones radiométricas del pH en función de la relación entre las intensidades de fluorescencia a 513 nm que se miden secuencialmente bajo excitación a 455 nm y 403 nm. Este método es esencial para las presentes mediciones sensibles a pequeños cambios del pH en el intervalo fisiológico alrededor de pH 7.

65

De acuerdo con una realización específica la sonda fluorescente está unida a una nanopartícula, tal como nanosensores, a fin de ampliar el seguimiento óptico específico radiométrica de diversos productos metabólicos: CO₂, NH₃, ácido láctico etc. Las mediciones de fluorescencia intracelular son extremadamente útiles en la investigación básica de los mecanismos fisiológicos de estimulación, por ejemplo, para la movilización de calcio y la despolarización de la membrana. Sin embargo, bajo respuesta celular homeostática, estas señales de estimulación intracelulares se vuelven transitorias. Por lo tanto, se consideran mucho menos adecuadas para el seguimiento sensible de la estimulación de PBL, en comparación con la acidificación extracelular acumulativa en curso que se registra en el ensayo de AM. Este seguimiento extracelular se puede facilitar mejor por la unión de sondas ópticas moleculares radiométricas a nanopartículas. El seguimiento extracelular es biocompatible, se minimizan los efectos negativos comunes a las mediciones de sondas intracelulares, que señala la ventaja de los métodos extracelulares no solo en investigación básica, sino también para diversas aplicaciones clínicas en diferentes tipos de células.

Los perfiles de acidificación se presentan por la tasa de secreción de equivalentes de H₂O-H⁺, en unidades de picomol/μl/hora/2500 células (véanse Figuras 6-8, 13).

Como indicador de la actividad metabólica de la célula puede usarse cualquiera de los perfiles de acidificación anteriores. Como alternativa, solo uno de los perfiles medidos es indicativo de la actividad metabólica de la célula.

Como se ha mencionado, la actividad metabólica de la célula se puede medir en células naive o células efectoras/activadas que han sido expuestas a diferentes concentraciones de un estimulante o un inhibidor.

Tal como se usa en el presente documento un "estimulante" o un "inhibidor" se refiere a una entidad que aumenta, reduce o modifica una ruta metabólica de una célula en respuesta al mismo.

Por ejemplo, si la célula es un linfocito, entonces el estimulante es un antígeno que es reconocido por el TCR o BCR y da lugar a la expansión clonal o producción de anticuerpos. Estimulantes o inhibidores específicos se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

Tabla 1

Unidades	Concentración	Papel	
μg/ml	0,4-50	PHA-L es un potente mitógeno para los linfocitos	H (PHA)
μg/ml	0,8-100	ConA es una lectina que se une a las glicoproteínas expresadas en la superficie de las células T, imitando de ese modo la activación del receptor de la célula T que elude el requisito de señales co-estimuladoras.	C (CONA)
ng/ml	0,03-10	El miristato acetato de forbol (PMA) mimetiza el diacilglicerol y activa la proteína quinasa C y por lo tanto, eventualmente, las células T. El PMA actúa selectivamente sobre una subpoblación de linfocitos T que tiene una alta afinidad por eritrocitos de oveja (SRBC) y es distinto del que responde a PHA.	P (PMA)
ng/ml	0,03-10	El lipopolisacárido (LPS) activa fuertemente los macrófagos, monocitos y células B.	S (LPS)
μg/ml	0,4-50	Linfocitos específicos de la proteína básica de mielina (MBP) (CD4, CD8, y células NK (CD56 + CD3-)) (26)	M (MBP) (87-99aa)
μg/ml	0,08-1	Un antígeno de tejido normal. Este péptido (H-Ala-Ala-Gly-Ile-Gly-Ile-Leu-Thr-Val-OH) es el epítipo inmunodominante reconocido por la mayoría de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de melanoma.	N (MelanA) (27-35aa)
μg/ml	0,4-50	Un antígeno específico de tejido de la próstata normal. Este péptido es reconocido por los linfocitos T citotóxicos (CTL). Se encuentra como marcador bioquímico del cáncer de próstata y cáncer de mama.	A (PSA) (146-154aa)
mM	0,04-5	Se ha sabido durante muchos años que linfocitos y macrófagos utilizan la glucosa a una tasa elevada, y hasta que se identificó la importancia del papel de la glutamina, la glucosa se consideró el único combustible utilizado para proporcionar energía a las células del sistema inmunológico.	G (glucosa)
mM	0,03 - 4	La glutamina se utiliza a altas tasas por células aisladas del sistema inmunológico. Es una fuente de energía alternativa especialmente para células que tienen altas demandas de energía.	L (l-glutamina)

nM	0,6 - 50	Inhibe la diana de mamífero de la vía de rapamicina (mTOR) uniendo directamente el Complejo mTOR 1 (mTORC1). Un estudio reciente informa que la rapamicina podría ser particularmente eficaz en el bloqueo de los linfocitos T y B activados. Otro estudio informa que promueve selectivamente la activación y expansión de células T reguladoras altamente supresoras.	R (rapamicina)
----	----------	---	-------------------

A continuación se proporcionan otros ejemplos.

El estimulante o inhibidor puede ser una célula o un estimulante o un inhibidor asociado a células. Los ejemplos de células estimulantes incluyen, pero no se limitan a, leucocitos, células madre, plaquetas, glóbulos rojos de la sangre, bacterias y hongos. Un estimulante o inhibidor de células de este tipo puede referirse a una célula intacta o un fragmento de célula, por ejemplo, la membrana celular.

El uso de un estimulante de células específicamente es ventajoso en reacciones de linfocitos mixtos (MLR) para su uso en aplicaciones de trasplante como para la predicción del rechazo del injerto (compatibilidad de tejidos), prevenir o tratar la enfermedad injerto contra huésped o rechazo del injerto. En tal caso el estimulante es un linfocito que no es singénico con respecto a la célula.

Como alternativa, el estimulante o inhibidor puede estar libre de células tal como un antígeno libre de células (por ejemplo, antígeno soluble, virus, un fluido biológico celular). Los ejemplos específicos de los estimulantes o inhibidores libres de células, incluyen, pero no se limitan a, metabolitos, nutrientes (por ejemplo, glucosa), mitógenos, péptidos, citoquinas, hormonas, vitaminas, fármacos, anticuerpos, neurotransmisores, antígenos específicos de cáncer y diversos antígenos normales específicos de tejidos asociados a enfermedades (TNA).

Los ejemplos específicos de antígenos restringidos por el MHC (péptidos) incluyen, pero no se limitan a CEA (antígeno carcinoembrionario), MUC-1, HER2, CD340, MAGE y prolactina (otros se listan en Renkvist et al. 2001 "A listing of human tumor antigens recognized by T cells". Cancer Immunol. Immunotherapy 50:3-15).

El estimulante o inhibidor se pone en contacto con la célula a diversas concentraciones.

El estimulante o inhibidor se selecciona de acuerdo con la patología sospechada. Por ejemplo, en aplicaciones de fertilización in vitro se examina la AM en curso de las secreciones del embrión a su líquido extracelular. Alternativa o adicionalmente, los perfiles de estimulación de la AM de las PBL madre se examinan por estimulación de las secreciones del embrión.

En los ensayos de detección, las células se ponen en contacto con una pluralidad de estimulantes o inhibidores, y los perfiles de acidificación se supervisan de forma concomitante para cada reacción de ese tipo.

Por lo tanto, el ensayo de AM, como se describe anteriormente se puede realizar en un número limitado de muestras (por ejemplo, utilizando una placa de cultivo de tejido) o en una pluralidad de muestras, cribando la respuesta a una pluralidad de estimulantes/inhibidores o cribando una pluralidad de muestras de diferentes pacientes o una combinación de los mismos. Se puede realizar el cribado de alto rendimiento usando una placa de múltiples pocillos, un lector de placas de múltiples pocillos (para la detección de la señal fluorescente), una cámara CCD aplicando análisis de imagen o matrices de fibra óptica.

De acuerdo con una forma de realización, los perfiles de acidificación resultantes se registran y se almacenan en una base de datos tal como en un medio legible por ordenador a fin de permitir la manipulación de datos y la construcción de modelos computacionales. Como se usa en este documento, "medio legible por ordenador" se refiere a cualquier medio que puede ser leído y con acceso directo con un ordenador. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento magnéticos, tales como disquetes, medios de almacenamiento de disco duro, y cinta magnética; medios de almacenamiento óptico tales como discos ópticos o CD-ROM; medios de almacenamiento eléctricos tales como RAM y ROM; e híbridos de estas categorías tales como medios de almacenamiento magneto/ópticos. La selección y el uso de los medios de almacenamiento adecuados se encuentran dentro de las capacidades de un experto en la técnica.

Como se usa en este documento, "registro" se refiere a un proceso de almacenar información en un medio legible por ordenador.

La robustez y exactitud de la metodología actual sugiere su uso en numerosas aplicaciones clínicas.

Así, según un aspecto de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad asociada con una actividad metabólica modificada en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

medir de manera independiente en un entorno extracelular de una célula los perfiles de acidificación dependientes del tiempo de dicho sujeto debido a la secreción de:

(i) productos metabólicos solubles no volátiles;
 (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
 (iii) productos metabólicos solubles volátiles en los que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependiente del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula y mientras que un cambio en la actividad metabólica en comparación con la de una muestra de células normales no afectadas examinadas en condiciones idénticas es indicativo de una enfermedad asociada con la actividad metabólica modificada.

El sujeto puede ser un animal sano o un sujeto humano sometido a un chequeo rutinario. Como alternativa, el sujeto puede estar en riesgo de tener una enfermedad asociada con una actividad metabólica modificada tal como cáncer (por ejemplo, un sujeto predispuesto genéticamente, un sujeto con historial médico y/o familiares con cáncer, un sujeto que ha sido expuesto a agentes carcinógenos, riesgo laboral, peligro ambiental) y/o un sujeto que muestra signos clínicos sospechosos de cáncer [por ejemplo, sangre en las heces o melena, dolor inexplicable, sudoración, fiebre inexplicada, pérdida inexplicada de peso hasta anorexia, cambios en los hábitos intestinales (estreñimiento y/o diarrea), tenesmo (sensación de defecación incompleta, para cáncer rectal específicamente), anemia y/o debilidad general].

Tal como se usa en el presente documento "una enfermedad asociada con una actividad metabólica modificada" se refiere a una enfermedad que se caracteriza por una población celular que ha experimentado un cambio en la actividad metabólica en comparación con una población de células idénticas tomada de una población normal sana (no afectada con la enfermedad). Esa población de células que ha experimentado un cambio en la actividad metabólica, puede ser una población de células patógenas (es decir, células causantes de enfermedades, por ejemplo, células cancerosas) o una población de células no patógenas (por ejemplo, células que combaten la enfermedad, por ejemplo, células inmunológicas tales como en el caso de tumor sólido). Por ejemplo, como se describe anteriormente, en oncología, la mayoría de las células cancerosas predominantemente y algunas poblaciones del sistema inmunológico que se someten a expansión clonal producen energía por una alta tasa de glicólisis seguido por la producción de ácido láctico en el citosol, en lugar de por una tasa relativamente baja de glicólisis seguido de la oxidación de piruvato en la mitocondria, como la mayoría de las células normales (véase Figura 1).

Muestras biológicas celulares que pueden utilizarse de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no están limitadas a, sangre (por ejemplo, leucocitos de sangre periférica, células mononucleares de sangre periférica, sangre completa, sangre del cordón umbilical), una biopsia de tejido sólido, líquido cefalorraquídeo, orina, fluidos linfáticos y diversas secreciones externas de los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, líquido sinovial, líquido amniótico y vellosidades coriónicas.

Las biopsias incluyen, pero no se limitan a, biopsias quirúrgicas, incluyendo biopsia incisional o excisional, aspirados con aguja fina y similares, resecciones completas o fluidos corporales. Los métodos de recuperación de la biopsia son bien conocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diagnosis" o "diagnóstico" se refiere a determinar la presencia o ausencia de una patología (por ejemplo, una enfermedad, trastorno, condición o síndrome), la clasificación de una patología o un síntoma, la determinación de la severidad de la patología, el seguimiento de la progresión de la patología, la previsión de un resultado de una patología y/o perspectivas de recuperación y cribado de un sujeto para una enfermedad específica.

De acuerdo con las presentes enseñanzas los perfiles de acidificación de una muestra normal sana (no afectada) de composición de células idénticas se determinan en condiciones idénticas a las que fueron utilizadas para hacer el seguimiento de las células del sujeto.

Una vez se obtienen los perfiles de acidificación (por ejemplo, con o sin estimulante/inhibidor), se registra(n) el perfil(es). Un desplazamiento (es decir, un cambio) en la actividad metabólica entre las células del sujeto y las del control (normal, no afectado), como se pone en evidencia a partir de los perfiles de acidificación obtenidos en condiciones idénticas, es indicativo de una enfermedad asociada con los perfiles de actividad metabólica modificada.

Los resultados del ensayo de la actividad metabólica pueden estar sujetos a los modelos de árboles de decisión que clasifican los resultados y ayudan en el diagnóstico final. De acuerdo con una realización preferida, se combinan al menos dos modelos (véanse las Figuras 9 y 10). Ejemplos de dichos modelos incluyen, pero no se limitan a, CHAID, C5 y C & R Tree. Además se puede aplicar el modelo logístico.

Los ejemplos de condiciones médicas que pueden ser diagnosticadas y tratadas (como se describe adicionalmente a continuación) de acuerdo con las presentes enseñanzas incluyen, pero no se limitan a, cáncer, infección por patógenos y enfermedades autoinmunes. Más adelante se proporcionan ejemplos específicos.

- 5 Enfermedades inflamatorias - incluyen, pero no se limitan a, enfermedades inflamatorias crónicas y las enfermedades inflamatorias agudas.

Enfermedades inflamatorias asociadas con la hipersensibilidad

- 10 Los ejemplos de hipersensibilidad incluyen, pero no se limitan a, hipersensibilidad de tipo I, hipersensibilidad de tipo II, hipersensibilidad de tipo III, hipersensibilidad de tipo IV, hipersensibilidad inmediata, hipersensibilidad mediada por anticuerpos, hipersensibilidad mediada por complejos inmunes, hipersensibilidad mediada por linfocitos T y DTH.

Hipersensibilidad de tipo I o inmediata, tal como el asma.

- 15 La hipersensibilidad de tipo II hipersensibilidad incluye, pero no se limitan a, enfermedades reumatoides, enfermedades autoinmunes reumatoide, artritis reumatoide (Krenn V. et al., *Histol Histopathol* 2000 jul; 15 (3): 791), espondilitis, espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., *Arthritis Res* 2001; 3 (3): 189), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunes sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Erikson J. et al., *Immunol Res* 1998; 17 (1-2): 49), esclerosis, esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., *Clin Diagn Lab Immunol* 1999 mar; 6 (2): 156); Chan OT. et al., *Immunol Rev* 1999 jun; 169: 107), enfermedades glandulares, enfermedades autoinmunes glandulares, enfermedades autoinmunes pancreáticas, diabetes, diabetes tipo I (Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract* 1996 oct; 34 Suppl: S125), enfermedades de la tiroides, enfermedades autoinmunes de la tiroides, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000 jun; 29 (2): 339), tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea (Braley-Mullen H. y Yu S, *J Immunol.* 15 de dic de 2000; 165 (12): 7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho*, 1999 Agos; 57 (8): 1810), mixedema, mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho*, 1999 Agos; 57 (8): 1759); enfermedades reproductivas autoinmunes, enfermedades ováricas, autoinmunidad ovárica (Garza KM et al., *J Reprod Immunol* 1998 feb; 37 (2): 87), infertilidad anti-esperma autoinmune (Diekman AB et al., *Am J Reprod Immunol* 2000 mar; 43 (3): 134), pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Suppl. 2: S107-9), enfermedades neurodegenerativas, enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunes, esclerosis múltiple (Cross AH et al., *J Neuroimmunol* 2001 ene 1; 112 (1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron I. et al., *J. Neural Transm Suppl* 1997; 49: 77), miastenia gravis (Infante AJ y Kraig E., *Int Rev Immunol* 1999; 18 (12): 83), neuropatías motoras (Kornberg AJ. *J Clin Neurosci* 2000 mayo; 7 (3): 191), síndrome de Guillain-Barre, neuropatías y neuropatías autoinmunes (Kusunoki S. *Am J Med Sci* 2000 abr; 319 (4): 234), enfermedades miasténicas, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J Med Sci* 2000 abr; 319 (4): 204), enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelar, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásico, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatías, poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC. y Honnorat J. *Rev Neurol (París)* 2000); neuropatías, neuropatías disímunes (Nobile-Orazio E. et al., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999; 50: 419); neuromiotonía, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., *Ann NY Acad Sci* 13 de mayo de 1998; 841: 482), enfermedades cardiovasculares, enfermedades cardiovasculares autoinmunes, aterosclerosis (Matsuura E. et al., *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus* 1998; 7 Suppl. 2: S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Suppl. 2: S107-9), granulomatosis, granulomatosis de Wegener, arteritis, arteritis de Takayasu y síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr* 25 de agosto de 2000; 112 (15-16): 660); enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost.* 2000; 26 (2): 157); vasculitis, vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis, glomerulonefritis necrotizante focal pauci- inmune, glomerulonefritis semilunar (Noel LH *Ann Med Interne (París)* mayo de 2000; 151 (3): 178); síndrome antifosfolípido (Flamholz R. et al., *J Clin Apheresis* 1999; 14 (4): 171); insuficiencia cardíaca, anticuerpos β -adrenoceptores de tipo agonista en insuficiencia cardíaca (Wallukat G. et al., *Am J Cardiol* 17 jun 1999; 83 (12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int* 1999 abr-jun; 14 (2): 114); anemia hemolítica, anemia hemolítica autoinmune (Efremov DG et al., *Leuk Lymphoma* 1998 ene; 28 (3-4): 285), enfermedades gastrointestinales, enfermedades autoinmunes del tracto gastrointestinal, enfermedades intestinales, enfermedad intestinal inflamatoria crónica (García Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol* 2000 ene; 23 (1): 16), enfermedad celíaca (Landau YE y Shoenfeld Y. *Harefuah* 16 ene 2000; 138 (2): 122), enfermedades autoinmunes de la musculatura, miositis, miositis autoinmune, síndrome de Sjogren (Feist E. et al., *Int Arch Allergy Immunol* 2000 sep; 123 (1): 92); enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli D. et al., *Biomed Pharmacother* 1999 jun; 53 (5-6): 234), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunes hepáticas, hepatitis autoinmune (Manns MP. *J Hepatol* 2000 agos; 33 (2): 326) y cirrosis biliar primaria (Strassburg CP et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999 jun; 11 (6): 595).

- La hipersensibilidad de tipo IV o mediada por células T, incluye, pero no se limita a, enfermedades reumatoides, artritis reumatoide (Tisch R, McDevitt HO *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 18 ene 1994; 91 (2): 437), enfermedades sistémicas, enfermedades autoinmunes sistémicas, lupus eritematoso sistémico (Datta SK, *Lupus* 1998; 7 (9): 591), enfermedades glandulares, enfermedades glandulares autoinmunes, enfermedades pancreáticas, enfermedades autoinmunes pancreáticas, diabetes de tipo 1 (Castano L. y Eisenbarth GS *Ann Rev. Immunol* 8:

647); enfermedades de la tiroides, enfermedades autoinmunes de la tiroides, enfermedad de Graves (Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol* 1993 mar; 92 (1): 77); enfermedades ováricas (Garza KM et al., *J Reprod Immunol* 1998 feb; 37 (2): 87), prostatitis, prostatitis autoinmune (Alexander RB et al., *Urology* 1997 dic; 50 (6): 893), síndrome poliglandular, síndrome poliglandular autoinmune, síndrome poliglandular autoinmune de tipo I (Hara T. et al., *Blood* 1991 mar 1; 77 (5): 1127), enfermedades neurológicas, enfermedades neurológicas autoinmunes, esclerosis múltiple, neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994 mayo; 57 (5): 544), miastenia gravis (Oshima M. et al., *Eur J Immunol* 1990 dic; 20 (12): 2563), síndrome del hombre rígido (Hiemstra SA. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 27 mar 2001; 98 (7): 3988), enfermedades cardiovasculares, autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., *J Clin Invest* 1996 oct 15; 98 (8): 1709), púrpura trombocitopénica autoinmune (Semple JW et al., *Blood* 15 mayo 1996; 87 (10): 4245), autoinmunidad anti-linfocitos T ayudantes (Caporossi AP et al., *Viral Immunol* 1998; 11 (1): 9), anemia hemolítica (Sallah S. et al., *Ann Hematol* 1997 mar; 74 (3): 139), enfermedades hepáticas, enfermedades autoinmunes hepáticas, hepatitis, hepatitis activa crónica. Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol* 1990 mar; 54 (3): 382), cirrosis biliar, cirrosis biliar primaria (Jones DE. *Clin Sci (Colch)* nov 1996; 91 (5): 551), enfermedades nefríticas, enfermedades nefríticas autoinmunes, nefritis, nefritis intersticial (Kelly CJ *J Am Soc Nephrol* 1990 agos; 1 (2): 140), enfermedades del tejido conectivo, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunes del tejido conectivo, enfermedad autoinmune del oído (Yoo TJ et al., *Cell Immunol* agos 1994; 157 (1): 249), enfermedad del oído interno (Gloddek B. et al., *Ann NY Acad Sci.* 29 dic 1997; 830: 266), enfermedades de la piel, enfermedades cutáneas, enfermedades dérmicas, enfermedades bullosas de la piel, pénfigo vulgar, penfigoide bulloso y pénfigo foliáceo.

Los ejemplos de hipersensibilidad de tipo retardado incluyen, pero no se limitan a, dermatitis de contacto y erupción medicamentosa.

Ejemplos de tipos de linfocitos T que median hipersensibilidad incluyen, pero no se limitan a, linfocitos T ayudantes y linfocitos T citotóxicos.

Ejemplos de hipersensibilidad mediada por linfocitos T ayudantes incluyen, pero no se limitan a, hipersensibilidad mediada por linfocitos T_{H1} e hipersensibilidad mediada por linfocitos T_{H2}.

Enfermedades autoinmunes

Incluyen, pero no se limitan a, enfermedades cardiovasculares, enfermedades reumatoides, enfermedades glandulares, enfermedades gastrointestinales, enfermedades cutáneas, enfermedades hepáticas, enfermedades neurológicas, enfermedades musculares, enfermedades nefríticas, enfermedades relacionadas con la reproducción, enfermedades del tejido conectivo y enfermedades sistémicas.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a aterosclerosis (Matsuura E. et al., *Lupus* 1998; 7 Suppl 2: S135), infarto de miocardio (Vaarala O. *Lupus* 1998; 7 Suppl. 2: S132), trombosis (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Suppl. 2: S107-9), granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu, síndrome de Kawasaki (Praprotnik S. et al., *Wien Klin Wochenschr*, 25 de agosto de 2000; 112 (15-16): 660), enfermedad autoinmune anti-factor VIII (Lacroix-Desmazes S. et al., *Semin Thromb Hemost.*2000; 26 (2): 157), vasculitis necrotizante de vasos pequeños, poliangeitis microscópica, síndrome de Churg y Strauss, glomerulonefritis necrotizante focal pauciinmune y semilunar (Noel LH. *Ann Med Interne (París)* mayo 2000; 151 (3): 178), síndrome antifosfolípidos (Flamholz R. et al., *J Clin Apheresis* 1999; 14 (4): 171), insuficiencia cardíaca inducida por anticuerpos (Wallukat G. et al., *Am J Cardiol* 1999 jun 17; 83 (12A): 75H), púrpura trombocitopénica (Moccia F. *Ann Ital Med Int* 1999 abr-jun; 14 (2): 114; Semple JW. et al., *Blood* 15 de mayo de 1996; 87 (10): (4245), anemia hemolítica autoinmune. Efremov DG et al., *Leuk Lymphoma* 1998 ene; 28 (3-4): 285; Sallah S. et al., *Ann Hematol* 1997 mar; 74 (3): 139), autoinmunidad cardíaca en la enfermedad de Chagas (Cunha-Neto E. et al., *J Clin Invest* 1996 oct 15; 98 (8): 1709) y autoinmunidad anti- linfocitos T ayudantes (Caporossi AP et al., *Viral Immunol* 1998; 11 (1): 9).

Ejemplos de enfermedades autoinmunes reumatoides incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide (Krenn V. et al., *Histol Histopathol* 2000 jul; 15 (3): 791; Tisch R, McDevitt HO *Proc Natl Acad Sci units SA* 18 ene 1994; 91 (2): 437) y espondilitis anquilosante (Jan Voswinkel et al., *Arthritis Res* 2001; 3 (3): 189).

Ejemplos de enfermedades glandulares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedad pancreática, diabetes tipo I, enfermedad de la tiroides, enfermedad de Graves, tiroiditis, tiroiditis autoinmune espontánea, tiroiditis de Hashimoto, mixedema idiopático, autoinmunidad ovárica, infertilidad anti-esperma autoinmune, prostatitis autoinmune I y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I. Las enfermedades incluyen, pero no se limitan a enfermedades autoinmunes del páncreas, diabetes tipo 1 (Castano I. y Eisenbarth GS.; Zimmet P. *Diabetes Res Clin Pract* 1996 oct; 34 Supl: S125), enfermedades autoinmunes de la tiroides, enfermedad de Graves (Orgiazzi J. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000 jun; 29 (2): 339; Sakata S. et al., *Mol Cell Endocrinol* 1993 mar; 92 (1): 77), tiroiditis autoinmune espontánea (Bralej-Mullen H. y Yu S, *J Immunol* 15 dic 2000; 165 (12): 7262), tiroiditis de Hashimoto (Toyoda N. et al., *Nippon Rinsho* 1999 agos; 57 (8): 1810), mixedema idiopático (Mitsuma T. *Nippon Rinsho* 1999 agos; 57 (8): 1759), autoinmunidad ovárica (Garza KM et al., *J Reprod Immunol* 1998 feb; 37 (2): 87),

infertilidad anti-esperma autoinmune (Diekman AB et al., *Am J Reprod Immunol.* 2000 mar; 43 (3): 134), prostatitis autoinmune (Alexander RB et al., *Urology* 1997 dic; 50 (6): 893) y síndrome poliglandular autoinmune de tipo I (Hara T. et al., *Blood*, 1 mar 1991; 77 (5): 1127).

5 Ejemplos de enfermedades gastrointestinales autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades intestinales inflamatorias crónicas (García Herola A. et al., *Gastroenterol Hepatol* 2000 ene; 23 (1): 16), enfermedad celíaca (Landau YE y Shoenfeld Y. *Harefuah* 16 Enero 2000; 138 (2): 122), colitis, ileitis y enfermedad de Crohn.

10 Ejemplos de enfermedades cutáneas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades ampollosas autoinmunes de la piel, tales como, pero que no se limitan a, pénfigo vulgar, penfigoide ampollar y pénfigo foliáceo.

15 Ejemplos de enfermedades hepáticas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, hepatitis, hepatitis activa crónica autoinmune (Franco A. et al., *Clin Immunol Immunopathol* 1990 mar; 54 (3): 382), cirrosis biliar primaria (Jones DE *Clin Sci (Colch)* 1996 nov; 91 (5): 551; Strassburg CP et al., *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999 jun; 11 (6): 595) y hepatitis autoinmune (Manns MP *J Hepatol* 2000 agos; 33 (2): 326).

20 Los ejemplos de enfermedades neurológicas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple (Cross AH et al., *J Neuroimmunol* 1 ene 2001; 112 (1-2): 1), enfermedad de Alzheimer (Oron I. et al., *J. Neural Transm Suppl* 1997; 49: 77), miastenia gravis (Infante AJ y Kraig E, *Int Rev Immunol* 1999; 18 (1-2): 83; Oshima M. et al., *Eur J Immunol* 1990 dic; 20 (12): 2563), neuropatías, neuropatías motoras (Kornberg AJ *J Clin Neurosci*, 2000 mayo; 7 (3): 191); síndrome y neuropatías autoinmunes de Guillain-Barre (Kusunoki S. *Am J Med Sci* 2000 abr; 319 (4): 234), miastenia, síndrome miasténico de Lambert-Eaton (Takamori M. *Am J Med Sci* 2000 abr; 319 (4): 204); enfermedades neurológicas paraneoplásicas, atrofia cerebelosa, atrofia cerebelosa paraneoplásica y síndrome del hombre rígido (Hiemstra HS et al., *Proc Natl Acad Sci units SA* 27 mar 2001; 98 (7): 3988); síndrome no paraneoplásico del hombre rígido, atrofas progresivas del cerebelo, encefalitis, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette y poliendocrinopatías autoinmunes (Antoine JC y Honnorat J. *Rev Neurol (París)* 2000 ene; 156 (1): 23); neuropatías disímunes (Nobile-Orazio E. et al., *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 1999; 50: 419); neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple congénita (Vincent A. et al., *Ann NY Acad Sci*, 13 mayo 1998, 841: 482), neuritis, neuritis óptica (Soderstrom M. et al., *J Neurol Neurosurg Psychiatry* mayo 1994; 57 (5): 544) y enfermedades neurodegenerativas.

35 Ejemplos de enfermedades musculares autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, miositis, miositis autoinmune y síndrome de Sjögren primario (Feist E. et al., *Int Arch Allergy Immunol* 2000 sep; 123 (1): 92) y enfermedad autoinmune del músculo liso (Zauli. D. et al., *Biomed Pharmacother* 1999 jun; 53 (5-6): 234).

Ejemplos de enfermedades autoinmunes nefríticas incluyen, pero no se limitan a, nefritis y nefritis intersticial autoinmune (Kelly CJ *J Am Soc Nephrol* 1990 agos; 1 (2): 140).

40 Ejemplos de enfermedades autoinmunes relacionadas con la reproducción incluyen, pero no se limitan a, pérdida fetal repetida (Tincani A. et al., *Lupus* 1998; 7 Suppl. 2: S107-9).

45 Ejemplos de enfermedades autoinmunes del tejido conectivo incluyen, pero no se limitan a, enfermedades del oído, enfermedades autoinmunes del oído (Yoo TJ et al., *Cell Immunol* 1994 agos; 157 (1): 249) y enfermedades autoinmunes del oído interno (Gloddek B. et al., *Ann NY Acad Sci* 29 dic 1997; 830: 266).

Ejemplos de enfermedades sistémicas autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico (Erikson J. et al., *Immunol Res* 1998; 17 (1-2): 49) y esclerosis sistémica (Renaudineau Y. et al., *Clin Diagn. Lab Immunol* 1999 mar; 6 (2): 156); Chan OT. et al., *Immunol Rev* 1999 jun; 169: 107).

50 Enfermedades infecciosas

55 Ejemplos de enfermedades infecciosas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades infecciosas crónicas, enfermedades infecciosas subagudas, enfermedades infecciosas agudas, enfermedades víricas, enfermedades bacterianas, enfermedades por protozoos, enfermedades parasitarias, enfermedades fúngicas, enfermedades por micoplasma y enfermedades priónicas.

Enfermedades por rechazo de injertos

60 Los ejemplos de enfermedades asociadas con el trasplante de un injerto incluyen, pero no se limitan a, rechazo de injerto, rechazo de injerto crónico, rechazo de injerto subagudo, rechazo de injerto híperagudo, rechazo de injerto agudo y enfermedad de injerto contra huésped.

Enfermedades alérgicas

65 Ejemplos de enfermedades alérgicas incluyen, pero no se limitan a, asma, urticaria, alergia al polen, alergia al ácaro del polvo, alergia al veneno, alergia a cosméticos, alergia al látex, alergia química, alergia a medicamentos, alergia a

picaduras de insectos, alergia a caspa animal, alergia a plantas, alergia a la hiedra venenosa y alergia a los alimentos.

De acuerdo con una realización específica, la enfermedad es el cáncer.

5

Enfermedades cancerosas

Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma, y leucemia. Ejemplos particulares de enfermedades cancerosas, incluyen pero no se limitan a: leucemia mielóide tal como la leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda con maduración, leucemia promielocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda con un aumento de los basófilos, leucemia monocítica aguda, leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia; linfoma maligno, tal como de Birkitt no-Hodgkin; leucemia linfocítica, como la leucemia aguda linfoblástica, leucemia linfocítica crónica; enfermedades mieloproliferativas, tales como tumores sólidos de meningioma benignos, tumores mixtos de glándula salival, adenomas de colon; adenocarcinomas, tales como el cáncer de pulmón de células pequeñas, de riñón, útero, próstata, vejiga, ovario, colon, sarcomas, liposarcoma, mixoide, sarcoma sinovial, rhabdomyosarcoma (alveolar), condrosarcoma mixoide extraesquelético, tumor de Ewing; otros incluyen disgerminoma testicular y ovárico, retinoblastoma, tumor de Wilms, neuroblastoma, melanoma maligno, mesotelioma, mama, piel, páncreas, cuello del útero, próstata y ovario.

10

15

20

Por lo tanto, las presentes enseñanzas pueden usarse en la detección de enfermedades. A continuación se presenta una realización no limitante que se refiere a la detección precoz del cáncer.

25

Las presentes enseñanzas proporcionan un enfoque basado en el sistema inmunológico como herramienta de diagnóstico no invasiva para la detección precoz y la estadificación del cáncer. Los enfoques de diagnóstico convencionales se centran principalmente en la patología de los tejidos malignos y en antígenos y genes específicos del cáncer. Por el contrario, las presentes enseñanzas se centran en respuestas normales frente a respuestas anormales del sistema inmunológico como herramienta disponible naturalmente para la detección precoz y la estadificación del cáncer (así como de otras enfermedades). Por lo tanto, las presentes enseñanzas proporcionan un ensayo de sangre fisiológica funcional de alto rendimiento mediante la medición de perfiles de estimulación de la actividad metabólica de PBL (MASP) del sistema inmunológico en respuesta a un amplio espectro de estimulantes/inhibidores a diferentes concentraciones (metabolitos, nutrientes, mitógenos, péptidos naturales y sintéticos, citoquinas, hormonas, vitaminas, fármacos, anticuerpos, neurotransmisores, antígenos específicos de cáncer y diversos antígenos normales específicos de tejidos (TNA) asociados a la enfermedad). Se anticipan efectos relativamente pequeños por puntos de vista convencionales de respuestas inmunológicas, incluso en la "expansión clonal" de subpoblaciones efectoras de PBL. Sin embargo, en términos de "biología de sistemas", se puede amplificar una respuesta de un subgrupo menor mediante la estimulación de toda la red. Se sugiere que el sistema inmunológico combate el cáncer por su función regular al detectar altos niveles anormales de TNA. La actividad metabólica de PBL también se puede utilizar para el diagnóstico de las fases avanzadas del desarrollo del cáncer. En la etapa de tumor local, la respuesta de muerte eficaz del sistema inmunológico ya está limitada, siendo incapaz de destruir el tejido tumoral, aunque se observan linfocitos específicos infiltrantes de tumor (TIL). Sin embargo, en esta etapa dichos linfocitos T circulantes todavía podrían ser responsables de la muerte de células cancerosas circulantes separadas. El cambio de un tumor local a una fase metastásica apunta a un fallo específico completo del sistema inmunológico, y esta transición se puede medir por cambios característicos en los perfiles de estimulación de la AM.

30

35

40

45

El diagnóstico de la enfermedad realizado de acuerdo con las presentes enseñanzas va seguido por la justificación de los resultados del cribado utilizando métodos de criterios de referencia. Una vez establecido el diagnóstico, ya sea basándose en las presentes enseñanzas o justificándolo con métodos del criterio de referencia oro, el sujeto es informado del diagnóstico y tratado según sea necesario.

50

Se apreciará que las presentes enseñanzas tienen una variedad de aplicaciones relativas a la optimización individual del tratamiento de la enfermedad, el seguimiento del tratamiento de la enfermedad en un sujeto, la determinación de un tratamiento para un sujeto y la identificación de un agente capaz de tratar una enfermedad asociada con la actividad metabólica anormal.

55

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para optimizar individualmente el tratamiento de la enfermedad, comprendiendo el método:

60

- (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto que comprende una célula con al menos un medicamento;
- (b) medir de manera independiente en un ambiente extracelular de la célula los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

65

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles en los que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii)

se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependiente del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula y mientras que un cambio en la actividad metabólica de la célula hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas es indicativo de un medicamento eficaz para la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento "optimizar el tratamiento individualmente" se refiere a un método ex vivo de adaptación del régimen de tratamiento (por ejemplo, el tipo de medicamento, la dosis).

Tal como se usa en el presente documento un "medicamento" se refiere a una formulación de una medicina, fármaco medicinal o medicación, como se utiliza en el presente documento de forma intercambiable. Ejemplos de medicamentos, incluyen, pero no se limitan a, quimioterapia, antibióticos, antiparasitarios, antivirales y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "poner en contacto" se refiere a llevar el medicamento a las proximidades de una célula en condiciones tales que el medicamento entre en contacto con la membrana celular y si es necesario se internalice en ella. Así, por ejemplo, el contacto debe efectuarse bajo condiciones de tampón, a una temperatura y un tiempo suficientes para permitir que el medicamento afecte al fenotipo celular (por ejemplo, efecto citotóxico o citostático). El contacto se efectúa in vitro o ex vivo. La puesta en contacto puede efectuarse en un recipiente que también es capaz de detectar el producto de la reacción enzimática (es decir, en una celda electroquímica), de manera que se detecta la señal eléctrica en línea. Tales recipientes se describen adicionalmente en este documento a continuación. Como alternativa, la puesta en contacto puede efectuarse en un recipiente separado donde se lleva a cabo la detección de tal manera que es posible retirar continuamente muestras en puntos de tiempo particulares y poner tales muestras dentro de las células electroquímicas. Por lo tanto, la puesta en contacto puede efectuarse en un tubo de ensayo, matraz, cultivo de tejidos, chip, matriz, placa, microplaca, capilar, o similar. Las células se pueden poner en una placa de vibración después de la adición del sustrato para la mezcla completa y continua de los contenidos de las células.

De acuerdo con una realización específica, "un cambio en la actividad metabólica de la célula hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas" se refiere a al menos un 10 % de desplazamiento local o global (a lo largo del perfil) preferentemente hacia una identidad del 100 % a la muestra de células de control normales sanas.

Un cambio más allá de un umbral predeterminado tal como será determinado por el experto en la materia es indicativo de un tratamiento eficaz.

Del mismo modo, se proporciona un método de seguimiento del tratamiento de la enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método:

medir de manera independiente en un entorno extracelular de una célula de un sujeto tratado los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de los perfiles de acidificación dependiente del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula y mientras que un cambio en la actividad metabólica de las células hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas es indicativo de un tratamiento eficaz de la enfermedad. Por ejemplo, se sugiere que en la fase metastásica el perfil de AM podría retroceder próximo al perfil normal.

Del mismo modo, se proporciona un método de identificación de un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células, comprendiendo el método:

- (a) someter las células a un agente;
- (b) medir la actividad metabólica de las células después de (a) y opcionalmente antes de (a) de acuerdo con el método de la reivindicación 1, en el que un cambio en los perfiles de acidificación es indicativo de un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "agente" se refiere a una composición de ensayo que comprende un agente biológico o un agente químico

Ejemplos de agentes biológicos que se pueden analizar como posibles moduladores de la actividad metabólica de acuerdo con el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos, por ejemplo, polinucleótidos, ribozimas, ARNs y moléculas antisentido (incluyendo, sin limitación, ARN, ADN, híbridos de ARN/ADN, ácidos nucleicos peptídicos, y análogos de polinucleótidos que tienen alterada la estructuras de cadena principal u otras modificaciones químicas); proteínas, polipéptidos (por ejemplo, péptidos), hidratos de carbono, lípidos y fármacos candidatos a "molécula pequeña". Las "moléculas pequeñas" pueden ser, por ejemplo, compuestos de origen natural (por ejemplo, compuestos derivados de extractos de plantas, caldos microbianos, y similares) o compuestos orgánicos u organometálicos sintéticos que tienen pesos moleculares de menos de aproximadamente 10.000 Dalton, preferentemente menos de aproximadamente 5000 Dalton, y lo más preferentemente menos de aproximadamente 1500 Dalton.

Según una realización preferida de este aspecto de la presente invención los agentes son anti-cancerígenos, agentes anti-virales o antibióticos.

Ejemplos de las condiciones que se pueden analizar como posibles agentes anti-cancerígenos de acuerdo con el método de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, exposición a la radiación (como por ejemplo, radiación gamma, radiación UV, radiación X).

Se apreciará que el desplazamiento, como se usa en el presente documento, también puede ser un nivel diferente (por ejemplo, nivel superior) de AM en el mismo perfil; un cambio en el estado basal, y/o un cambio en la concentración del agente que induce el máximo efecto de AM.

Una vez se ha identificado un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células de acuerdo con las enseñanzas anteriores, la invención comprende además la síntesis del agente o su purificación a partir de una fuente natural.

Como se usa en el presente documento el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo pero no limitado a".

El término "que consiste en" significa "que incluye y limitado a".

El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, método o estructura pueden incluir ingredientes, pasos y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, pasos y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicada por la invención.

Como se usa en el presente documento, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

A lo largo de esta solicitud, diversas realizaciones de esta invención pueden presentarse en formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente en aras de la conveniencia y la brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, la descripción de un intervalo debe considerarse que desvela específicamente todos los posibles subintervalos, así como valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 se debe considerar que tienen subintervalos descritos específicamente tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que en el presente documento se indique un intervalo numérico, se entiende que incluye cualquier numeral citado (fraccionado o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "que oscila/oscila entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que oscila/oscila entre" un primer número indicado "y" un segundo número indicado se usa en este documento de forma intercambiable y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada incluyendo, pero no limitados a, aquellas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las artes químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se debe apreciar que ciertas características de la invención, que para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que por brevedad, se describen en el contexto de una única realización,

también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra forma de realización descrita de la invención. Ciertas características que se describen en el contexto de diversas realizaciones no han de considerarse características esenciales de estas formas de realización, a menos que la realización sea inviable sin esos elementos.

5 Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han delineado en el presente documento anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

10 **Ejemplos**

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

15 En general, la nomenclatura utilizada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, RM, ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se establecen en las patentes de Estados Unidos n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, JE, ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan JE, ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", WH Freeman and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic"; "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996).
 35 Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento, se cree que los procedimientos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

Ejemplo 1

40 Procedimientos experimentales

A. Requisitos de los donantes de sangre y extracción de sangre por expertos médicos

45 Las muestras de sangre se recogieron en Vacutubes de 9 ml con EDTA (Greiner Bio-One 455036). El estudio fue aprobado por las juntas de revisión institucional en el Centro Médico Sheba (Ramat Gan Israel) y el Ministerio de Salud de Israel, (Número de aprobación de Helsinki 7780-10-SMC).

B. Recolección de información demográfica y clínica del donante

50 Para la protección de la confidencialidad, todas las muestras de sangre recogidas se marcaron y codificaron inmediatamente para su utilización en los registros de base de datos y análisis de diagnóstico.

Los resultados del ensayo de AM se recogieron de 42 donantes sanos y 25 pacientes de cáncer de 22 a 81 años de edad (Tabla 2). Los donantes sanos son una población mixta que incluye casos tratados de presión arterial alta, niveles altos de colesterol, gripe leve e inflamación.

Tabla 2 - Características clínicas de los pacientes con cáncer: ac - adenocarcinoma, idc - carcinoma ductal invasivo, gej - unión gastroesofágica, NSCLC - Carcinoma de pulmón de células no pequeñas

Fase tumoral	Tipo de tumor	Género	Edad	Número de pacientes
1	idc de mama	Mujer	53	1
1	idc de mama	Mujer	64	2
2	idc de mama	Hombre	63	3
2	idc de mama	Mujer	37	4
2	idc de mama	Mujer	61	5

Fase tumoral	Tipo de tumor	Género	Edad	Número de pacientes
2	idc de mama	Mujer	38	6
2	idc de mama	Mujer	65	7
3	idc de mama	Mujer	32	8
3	idc de mama	Mujer	42	9
3	ac de NSCLC	Hombre	46	10
4	ac de NSCLC	Hombre	61	11
4	ac de NSCLC	Mujer	60	12
4	ac de NSCLC	Hombre	81	13
4	ac de colon	Mujer	70	14
4	Colon	Mujer	49	15
2	ac de colon	Mujer	56	16
2	ac de recto	Mujer	52	17
4	ac de recto	Hombre	74	18
3	ac gástrico	Hombre	47	19
4	gej gástrico	Hombre	64	20
3	Páncreas	Mujer	57	21
4	Páncreas	Hombre	58	22
4	Próstata	Hombre	77	23
1	Tiroides	Mujer	54	24
2	Cérvix	Mujer	35	25

C. Transporte de las muestras de sangre

5 Se toman medidas para mantener la viabilidad de las células sanguíneas en condiciones térmicas (refrigeración termoeléctrico (hasta 10 °C -18 °C) y agitando suavemente hasta la separación de las CMSP.

D₁. Separación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

10 Células mononucleares de sangre periférica frescas (CMSP) se aislaron por Ficoll-Paque (UNI-SEP Novamed) y centrifugación en gradiente. El sedimento se resuspendió en solución de trabajo (ST) (PBS con calcio y magnesio), incluyendo la sonda fluorescente (HPTS) a una concentración final de 5×10^6 células/ml.

D₂. Mediciones paralelas de alto rendimiento del ensayo de AM

15 Cada pocillo en una placa negra de 384 pocillos no adherente y de bajo volumen (Greiner Bio-One) se cargó con 10 μ l de la solución de CMSP y 10 μ l de solución de trabajo, además de HPTS que incluye uno de los diez reactivos en 8 concentraciones crecientes. Por lo tanto la concentración final de la sonda en cada pocillo fue de 1 μ M, y la concentración final de la CMSP fue $2,5 \times 10^6$ células/ml en solución de trabajo fisiológico 20 μ l que contiene tampón fosfato 10 mM aproximadamente a pH 7,3. Teniendo en cuenta la concentración media de CMSP en la sangre

20 periférica de adultos se seleccionó una concentración de trabajo de $2,5 \times 10^6$ células/ml. Se considera esta concentración de CMSP para asegurar dos aspectos: en primer lugar, para obtener una relación razonable de señal a ruido debido a la acumulación del producto durante al menos 1 hora, y segundo, para permitir la interacción intercelular. El mismo protocolo de carga de 10 μ l se llevó a cabo al menos por triplicado, primero en las muestras de CMSP y a continuación en los reactivos, a fin de obtener con precisión el volumen final de 20 μ l en la concentración

25 requerida en cada pocillo. Además, en cada ensayo se incluyeron dos tipos de controles: uno que incluye solamente la sonda (1 μ M), sin células y sin los estimulantes en 8 pocillos; el otro que incluye solo células sin estimulante, el estado basal, en 8 pocillos. El proceso de acidificación se controló cada 5 min durante 1 hora de incubación a 37 °C con un escáner de fluorescencia comercial (TECAN Infinite M200). En primer lugar, el escáner controla el proceso de acidificación sin sellar (modo "ABIERTO") durante 30 min (6 ciclos) y a continuación, para evitar la ventilación de

30 CO₂ y NH₃ de cada pocillo, la placa de múltiples pocillos se selló herméticamente (ThermalSeal RT™, (modo "CERRADO") EXCEL Scientific, Inc.). A continuación, el proceso de acidificación se controló de nuevo durante 30 min (6 ciclos). Con el fin de aumentar la relación de señal a ruido, las intensidades de fluorescencia a 513 nm se midieron secuencialmente bajo excitación a 455 nm y 403 nm por pocillo.

35 D₃. Tipo, espectro y preparación de los reactivos

En cada ensayo, los perfiles de actividad metabólica de las CMSP se controlaron en el estado basal y bajo la influencia de los siguientes diez reactivos diluidos en solución de trabajo en 8 concentraciones diferentes: PHA, CONA, PMA, LPS, MBP (28), MelanA, PSA (29), glucosa (24), L-glutamina y rapamicina (Strauss L, Czystowska M, Szajnik M, Mandapathil M, y Whiteside TL (2009) Differential responses of human regulatory T cells (Treg) and effector T cells to rapamycin. PLoS One 4(6):e5994). La selección de reactivos se realizó por su relación con el sistema inmunológico (Tabla 1, más arriba, nota, las concentraciones no están limitadas a las de la tabla, concentración = 0 a dosis no tóxica).

40

Se debe mencionar que otros reactivos están bajo calibración, por ejemplo: (hormonas tales como el estradiol, antígenos específicos de cáncer tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), citocinas y quimiocinas tales como IL-2, vitaminas, hormonas, fármacos, anticuerpos del sistema inmunológico, neurotransmisores, diferentes péptidos del cáncer y virus específicos o sus fragmentos tales como papilomavirus humano (HPV) (datos no mostrados).

D4. Medición radiométrica de la sonda fluorescente sensible al pH y calibración de la acidez de la ST

La sonda utilizada en este ensayo es ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS).

El HPTS es un indicador de pH impermeable a la membrana, rentable, no tóxico, y altamente soluble en agua con un pKa de ~7,3 en tampones acuosos. El HPTS presenta un cambio de absorción dependiente del pH, lo que permite mediciones radiométricas del pH en función de la relación entre las intensidades de fluorescencia a 513 nm que se miden secuencialmente bajo excitación a 455 nm y 403 nm. Este método es esencial para las presentes mediciones sensibles a pequeños cambios del pH en el intervalo fisiológico alrededor de pH 7.

Con el fin de cuantificar la sensibilidad de la sonda, se diluyó una solución madre de HPTS en agua hasta una concentración de 100 μM y a continuación a una concentración final de 1 μM y 10 μM . La calibración de la acidez de la ST se realizó para dos concentraciones de tampón: la ST (tampón fosfato 10 mM) y la ST diluida 5 veces por solución salina (tampón fosfato 2 mM) (Figuras 3A-D, Figuras 4A-B).

La curva de calibración final usada en el ensayo de AM se realizó por medio de mediciones del electrodo de vidrio del pH de valoración secuencial de la ST (que contiene 2 μM de HPTS). Las mediciones del pH y las mediciones de la fluorescencia de las muestras tituladas se llevan a cabo a 37 °C. Las muestras se cargan en una placa de múltiples pocillos y las intensidades de fluorescencia bajo EX403 nm y EX455 nm se miden a 513 nm utilizando el escáner de fluorescencia.

Para los estados “abierto” y “cerrado”, se construye una curva de calibración polinómica (Figuras 3C-D), que permite medir los valores de pH y equivalentes de acidificación acumulados en función de la relación entre las intensidades de fluorescencia medidas a 513 nm, bajo excitaciones a 403 nm y 455 nm, respectivamente.

Las ecuaciones obtenidas se utilizaron para el análisis de cada nuevo donante (Tabla 3, a continuación).

TABLA 3 - Ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración finales:

	X = intensidad de fluorescencia a Ex. 403 nm/intensidad de fluorescencia a Ex. 455 nm	
	pH	HCl ($\mu\text{Mol/ml}$)
Abierto	$Y = 0,011X^3 - 0,136X^2 + 0,641X - 1,528X + 8,266$	$Y = 0,006X^4 + 0,129X^3 - 0,982X^2 + 3,971X - 2,276$
Cerrado	$Y = 0,013X^4 - 0,164X^3 + 0,747X^2 - 1,723X + 8,415$	$Y = -0,006X^4 + 0,131X^3 - 1,011X^2 + 4,168X - 2,581$

E. Análisis de datos

La computación, el análisis y la minería de datos (Nisbet R, IV JE, & Miner G (2009) Handbook of Statistical Analysis and Data Mining Applications) se realizaron usando el siguiente paquete estadístico; Excel 2007, OriginPro 8, SAS Edición 9.2, el cliente de IBM PASW Modular 13.0 (formalmente llamada Clementine, parte de SPSS). Los resultados en las Figuras 6A-C-8A-D, 13 se expresan como medias \pm error típico de la media. La significación estadística entre los pacientes sanos y con cáncer para los modelos variantes se calculó usando chi-cuadrado. Los resultados se consideraron estadísticamente diferentes cuando $p < 0,05$.

Análisis de los datos del donante (que se resumen en diagrama de flujo del marco de pruebas de AM - Figura 12)

Preparación de datos

Etapa 0: Procesamiento y normalización de los datos del donante

Los datos en bruto de cada registro (donante) se procesaron para dar los resultados en términos de la velocidad de acidificación de la actividad metabólica en unidades de pmoles H^+ / $\mu\text{l/hora}/2500 \text{ CMSP}$.

Pre-procesamiento - Etapa 1a: Análisis de la sonda y la normalización de los datos del donante

Con el fin de mejorar la relación de señal a ruido, el análisis de la sonda se realizó mediante la realización del análisis de agrupamiento de medias k de todas las observaciones ($n = 730$) recogidas de todos los donantes (Figuras 5A-D). Estos resultados procesados se normalizaron restando los valores de los donantes de los valores medios de HPTS después de la eliminación de los valores atípicos de la sonda (no se eliminaron más del 5 % de los resultados).

Pre-procesamiento - Etapa 1b: Valores atípicos excluidos en los datos del donante

La normalización de los valores “CERRADO” y “ABIERTO” por los valores medios de “ABIERTO” y “CERRADO” para cada combinación de donante, dosis y estimulante. Las observaciones con puntuación estándar $> | 1,7 |$ se descartaron (1,77 % de los resultados).

Preparación de datos - Etapa 1c: Representación de los resultados de la actividad metabólica de los donantes

Después de eliminar los valores atípicos en cada donante, se calcularon por separado los valores medios de “ABIERTO” y “CERRADO” para cada donante basado en el promedio de los resultados al menos por triplicado para cada dosis y cada reactivo por donante. Estos resultados se usan más tarde como representación de la actividad metabólica de los donantes para cada reactivo y dosis. Los resultados se representan en gráficos 2D y gráficos 3D y se actualizarán automáticamente con cada donante.

Búsqueda del modelo de clasificación - Etapa 2: Algoritmo de minería de datos

Dado que la mayoría de los pacientes con cáncer estudiados tenían más de 39 años y con el fin de minimizar tanto como sea posible el efecto de la edad, se sometieron a ensayo y se analizaron dos cohortes de donantes de sangre, incluyendo hombres y mujeres. La primera cohorte incluye donantes con una edad por encima de 40 (n = 42 (21 donantes sanos y 21 pacientes con cáncer)) y la segunda cohorte incluye el conjunto completo de los donantes (n = 67 (42 donantes sanos y 25 pacientes con cáncer)) de 22 -81 años de edad. Para la clasificación de la etapa de 3 resultada en un conjunto de algoritmos de una familia de inducción de árboles/regla de decisión (C5, CART, CHAID, REGLA DE ASOCIACIÓN) y se utilizó el modelo lineal log (Regresión logística). Se utilizaron métodos de análisis exploratorios para investigar conexiones ocultas y no ocultas en los datos.

Evaluación del modelo - Etapa 3: Construcción y clasificación del modelo

Para la clasificación de los donantes en pacientes sanos y con cáncer, se utilizó un conjunto de la familia de diez modelos diferentes, incluyendo minería de datos, aprendizaje automático y modelos estadísticos aplicando el software de SAS 9.3 y Clementine (v13.0). Con el fin de evaluar y comparar el rendimiento de los modelos, se decidió utilizar el método gráfico que se basa en las tablas de ganancia acumulada producido por el software Clementine (v13.0) (Figuras 9A-D).

Modelos predictivos - Etapa 4: Evaluación utilizando un conjunto de validación del 30 % de los donantes de sangre

Datos como se describe en la etapa 3 se repartieron al azar en dos grupos de “Formación” y “Ensayo” utilizando el software Clementine (v13.0). El “conjunto de formación” se utiliza para construir el modelo de minería de datos e incluye el 70 % de los donantes. El 30 % restante de los donantes se utilizará para evaluar el resultado de la clasificación en el conjunto de “Ensayo” utilizando los modelos que se han generado en el conjunto de Formación (Figuras 10A-D).

Todo el proceso de análisis de datos se resume en el Diagrama de flujo del protocolo de ensayo de AM y marco de análisis (Figura 12).

Ejemplo 2

Diseño y características del ensayo de AM

Células mononucleares de sangre periférica frescas (CMSPH) se aislaron por Ficoll-Paque y centrifugación en gradiente de 42 donantes sanos y 25 pacientes con cáncer (Tabla 2, más arriba). Para cada muestra de sangre, una placa de 384 pocillos se cargó con 20 μ l que contenía solución de trabajo fisiológico a tampón 10 mM alrededor de pH 7,3, las CMSPH a una concentración final de $\sim 2,5 \times 10^6$ células/ml, sonda de pH 1 μ M (HPTS), y uno de los diez reactivos estimulantes en ocho concentraciones crecientes (Tabla 3, más arriba). El ensayo de AM se lleva a cabo utilizando un escáner de fluorescencia comercial. Los perfiles cinéticos de acidez extracelular se midieron en estados al aire libre (“ABIERTO”) o cerrados herméticamente (“CERRADO”). Ambos registros permiten medir las acumulaciones en tiempo real de productos metabólicos 'solubles' frente a 'volátiles' (ácido láctico frente a CO₂ y NH₃), diferenciando de esta manera entre la fosforilación oxidativa, la glicólisis anaeróbica y la glicólisis aeróbica (“efecto Warburg”) (Vander Heiden MG, Cantley LC, & Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. Science 324(5930):1029-1033). Los perfiles de la tasa de AM se calcularon y se examinaron para el diagnóstico del cáncer por análisis dinámico en línea, incluyendo las herramientas de minería de datos (Figura 12).

Ejemplo 3

Medición del pH extracelular por fluorescencia radiométrica y calibración de la acidez

5 La sonda de pH molecular radiométrica no tóxica impermeable a la membrana utilizada en el presente ensayo de AM es el ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico (HPTS) (Hakonen A & Hulth S (2008) A high-precision ratiometric fluorosensor for pH: implementing time-dependent non-linear calibration protocols for drift compensation. *Anal Chim Acta* 606(1):63-71; Han J & Burgess K (Fluorescent indicators for intracellular pH. *Chem Rev* 110(5):2709-2728) with a pKa of ~ 7.3 in aqueous physiological buffers. Es bien conocido por su baja toxicidad, a partir de mediciones del pH intracelular en muchos tipos de células, incluso con incubación durante la noche a 2 mM (Overly CC, Lee KD, Berthiaume E, & Hollenbeck PJ (1995) Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8):3156-3160). EN este caso, el HPTS es bastante utilizado para mediciones de pH extracelulares, a una baja concentración de 1 μM , que además asegura su no toxicidad. Se construyeron curvas de calibración polinómicas para los estados "ABIERTO" y "CERRADO", (Figuras 3A-D), lo que permite medir los valores de pH y equivalentes de acidificación acumulados como una función de la relación entre las intensidades de fluorescencia medidas a 513 nm, bajo excitaciones a 403 nm y 455 nm, respectivamente. Las curvas de calibración de acidificación se obtuvieron para la solución de trabajo (ST) y para la ST diluida 5 veces con solución salina (tampón fosfato 10 mM y 2 mM, respectivamente) (Figuras 3A-D). Como era de esperar, esta Figura verifica que la capacidad del tampón 10 mM permite aproximadamente cinco veces los valores de acidificación en comparación con la de la capacidad del tampón 2 mM, dentro del mismo rango de cambios de pH. Estos resultados indican acerca de la sensibilidad adecuada a la acidificación dentro del intervalo de pH fisiológico de 6,5 a 7,5. Otros resultados indican que el método de medición es independiente de la concentración de la sonda fluorescente entre 1-10 μM . El sistema es lo suficientemente sensible para proporcionar una alta relación de señal a ruido cuando la concentración final extracelular de HPTS es de solo 1 μM (Figuras 4A-B).

Las ecuaciones obtenidas a partir de las curvas de calibración final (Figuras 3A-D, Tabla 4) se utilizaron para el análisis cuantitativo de cambios medidos significativas en registros de actividad metabólica de CMSP de los 67 donantes (42 sanos y 25 pacientes con cáncer).

Ejemplo 4

Mejora de señal a ruido por análisis de agrupamiento de medios k dinámicos del fondo de HPTS

35 Con el objetivo de la evaluación clínica dinámica de los resultados del ensayo de AM, se desarrolló un método fiable que compara cualquier ensayo de AM para cada donante con ensayos anteriores con respecto a los valores de la tasa de referencia de la señal de HPTS ($n = 730$ observaciones). Con esta colección de datos es posible mejorar la relación de señal a ruido del ensayo de AM mediante el filtrado de resultados de referencia excepcionales. Para ese fin se aplicó el análisis de agrupamiento de medios k (Nisbet R, IV JE, & Miner G (2009) *Handbook of Statistical Analysis and Data Mining Applications*) por la acumulación de valores de la tasa normalizada de la sonda HPTS. En cada ensayo se examinaron al menos ocho pocillos de control, que contienen HPTS 1 μM en la solución de trabajo, sin células y sin estimulantes. Cada valor se normalizó teniendo en cuenta las observaciones acumuladas usando una puntuación estándar. La Figura 5A presenta la distribución de las puntuaciones estándar para valores de tasa "ABIERTA" y "CERRADA" de todos los ensayos de AM. Por análisis de agrupamiento de medios k se obtuvieron 26 grupos (Figura 5B), donde cada observación pertenece al grupo con la media más cercana. Los resultados reportados en la Figura 5D evalúan el funcionamiento estable de la sonda. De todos los resultados de referencia de HPTS ($n = 730$) solo 5 grupos (4,66 %) fueron descartados. Los 21 grupos restantes (95,34 %) fueron finalmente considerados para componer el intervalo de referencia normal. Los valores medios de los estados "ABIERTO" y los valores medios "CERRADOS" se volvieron a calcular para cada donante. El análisis de agrupamiento de medios k nos permite extraer de la sonda la señal de la tasa de fondo a partir de los datos celulares y de este modo obtener los valores de la tasa real de los resultados del ensayo de AM en curso.

Ejemplo 5

55 Perfiles de AM de muestras de control: (i) a concentraciones crecientes de reactivos en ausencia de células; (ii) con células pero sin reactivos

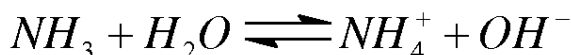
(i) Los experimentos de control en ausencia de células verificaron que los perfiles de acidificación obtenidos en presencia de células de hecho miden la tasa de actividad metabólica celular. Por lo tanto, no se obtuvo acidificación bajo el mismo protocolo aplicado en presencia de la sonda, tampón y cada reactivo al aumentar la concentración, pero sin células (por ejemplo, glucosa (Figura 6A) y PSA (Figura 8A)), en comparación con cambios claros de la acidificación en muestras con células. Se obtuvieron los mismos resultados de control para todos los reactivos. (ii) Se midió un nivel basal de acidificación en presencia de células en ausencia de cualquier reactivo, incluido la glucosa. Generalmente, este nivel basal aumentó con el aumento de las concentraciones de glucosa, verificando aspectos claros de la actividad metabólica celular (Figuras 6B-C). Además, los perfiles de AM en estado basal ya revelaron la tendencia general de un cambio de diagnóstico de la fosforilación oxidativa

dominante preferido por las CMSPH naive del 69 % de los donantes sanos, a la glicólisis aeróbica dominante ("efecto Warburg") preferido por CMSPH activadas del 60 % de diversos pacientes de cáncer. Estos resultados hacen hincapié en el potencial del ensayo de AM como herramienta de diagnóstico ya en estado basal, que es el escenario más cercano al estado in vivo. Sin embargo, el estado basal por sí solo no es suficiente para una diferenciación clara entre los pacientes sanos y con cáncer (Chi-cuadrado, $p = 0,45$). Con la minería de datos actual de todos los perfiles del ensayo de AM en respuesta a la red de los reactivos (Figuras 10A-D), se puede señalar significativamente al 95,24 % de los donantes sanos y al 88 % de los pacientes con cáncer (edad ≥ 4 Chi-cuadrado, $p < 0,0001$) y al 90,48 % de los donantes sanos y el 95,24 % de los pacientes con cáncer (22 \leq edad ≥ 81 , Chi-cuadrado, $p < 0,0001$).

Ejemplo 6

Comparación de los perfiles de AM a concentración creciente de glucosa, obtenidos para donantes sanos y pacientes típicos de cáncer de mama

En primer lugar, los perfiles de AM de donantes sanos (Figuras 6B, 7A) son sorprendentemente similares, a pesar de la diferencia significativa en la edad (45 (Figura 6B) frente a 69 (Figura 7A)) y el género. En segundo lugar, los resultados en la Figura 6A-C revelan diferencias significativas en los perfiles de AM entre dos donantes que representan un donante típico sano y una paciente de cáncer de mama in situ (en fase 2, y antes de cualquier tratamiento). Además, en experimentos preliminares donde se aplicó el ensayo de AM en pocos casos de enfermedades autoinmunes y enfermedades infecciosas adicionales no relacionados con el cáncer, ya se pusieron de manifiesto diferentes perfiles de actividad metabólica en comparación con los obtenidos para individuos sanos y pacientes de cáncer (datos no mostrados). Estas diferencias señalan a 3 índices de diagnóstico clínico de cáncer (Figuras 4A-C). Índice 1: tasa de AM "ABIERTA" > tasa de AM "CERRADA" en estado basal (células en la solución de trabajo sin reactivo). Índice 2: Tasa de AM "ABIERTA" > tasa de AM "CERRADA" para todas las concentraciones de glucosa. Índice de 3: Tasa de AM "ABIERTA" del cáncer > tasa de AM "ABIERTA" de individuos sanos y tasa de AM "CERRADA" de pacientes de cáncer > tasa de AM "CERRADA" de individuos sanos. Por lo tanto, los valores más altos de la fosforilación oxidativa se obtienen en CMSP frescas de muestras sanas en comparación con los valores más altos de la glicólisis aeróbica en CMSP frescas de muestras de cáncer. Como se ha mencionado en la introducción (Vander Heiden MG, Cantley LC, & Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324(5930):1029-1033.; Fox CJ, Hammerman PS, & Thompson CB (2005) Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 5(11):844-852; Michalek RD & Rathmell JC (The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* 236:190-202), estos resultados indican presumiblemente el desarrollo in vivo del "Efecto Warburg" en CMSPH activadas de pacientes con cáncer. Observaciones más detalladas sobre los resultados del ensayo de AM obtenidos para pacientes con cáncer (Figura 6C y Figuras 7B-D) revelan que en el estado "CERRADO" el índice de acidificación total es menor que en el estado "ABIERTO". Estos resultados indican un producto básico volátil que es responsable de la valoración parcial de la acidez debido al ácido láctico y el CO_2 . Esta valoración podría ser fisiológicamente necesaria tras el cambio metabólico a la producción de ácido láctico no volátil. Este papel está relacionado con el amoníaco (NH_3), que es uno de los productos primarios del catabolismo de las proteínas y las vías metabólicas de las purinas y pirimidinas. En el sistema de medición actual, como in vivo, las células vitales deben mantener el citoplasma a un pH constante de aproximadamente 7,2 a 7,4 por secreción metabólica simultánea tanto los productos ácidos como básicos, como se describe a continuación.



Se debe mencionar que en los análisis de 3 índices, se encontraron diferentes combinaciones en diferentes fases de varios tipos de cáncer (por ejemplo, colon, mama, pulmón, y páncreas) (Tabla 2, más arriba). Por lo tanto, por estas variaciones se cree que el examen de una colección de datos suficiente y el seguimiento de los donantes individuales proporcionará perfiles de diagnóstico fiables y más informativos, como se demuestra en el siguiente caso de estudio (Figuras 7A-D).

Ejemplo 7

Caso de estudio de seguimiento de los perfiles de AM, a concentración creciente de glucosa, que se obtiene para una mujer de 65 años de edad con cáncer de mama

Con respecto a las mediciones del ensayo de AM preliminar, se debe mencionar que por el presente ensayo fueron diagnosticados un caso de cáncer de tiroides y uno de cáncer de mama antes que los médicos. El caso del cáncer de mama fue seguido a lo largo de dos años como evidencia de la capacidad informativa sensible del ensayo de AM en comparación con la clasificación típica de la estadificación y los tratamientos. Este es el primer informe de un estudio de seguimiento de 2 años de un donante femenino, clínicamente diagnosticado de cáncer de mama un año después de que el ensayo de AM hubiera revelado un estado de cáncer. A modo de comparación, se presentan los perfiles de AM de un hombre sano típico de 69 años de edad (Figura 7A). Perfiles de AM del paciente con cáncer en

el momento cero, el paciente diagnosticado clínicamente con cáncer de mama un año después del ensayo de AM había revelado un estado de cáncer (es decir,) (Figura 7B). Los tres índices de diagnóstico del cáncer indican un cambio de la fosforilación oxidativa observada en los perfiles sanos (Figura 7A) a glicólisis aeróbica observada en los perfiles del caso de cáncer (Figuras 7B). En concreto, los valores positivos para "CERRADO-ABIERTO" de perfiles sanos (Figura 7A) y los valores negativos para "CERRADO-ABIERTO" obtenidos para los perfiles de cáncer (Figura 7B). El siguiente ensayo de AM obtenido para este caso de estudio se llevó a cabo 10,5 meses más tarde (Figura 7C), justo después del diagnóstico de una mamografía de rutina de idc de mama en fase 2. Cabe destacar que en ese momento la paciente no reportó síntomas fisiológicos o palpables.

A partir de ese momento, se llevó a cabo un ensayo de seguimiento de la AM cada 3 semanas. Un mes más tarde, se llevó a cabo la extirpación quirúrgica del tumor. Otro mes más tarde se le dio un tratamiento de quimioterapia cada 3 semanas. Cada ensayo de AM se llevó a cabo unos 20 días después de cada tratamiento, y 2 días antes del siguiente tratamiento. El último ensayo de AM presentado en este documento (Figura 7D) se llevó a cabo después del tercer tratamiento de quimioterapia, es decir, aproximadamente 2 meses después de comenzar el protocolo de quimioterapia (tiempo = (+) 14,5 meses). Debe tenerse en cuenta que de acuerdo con los tres índices del ensayo de AM, este último ensayo ya revela perfiles de AM (Figura 7D) característicos del donante sano (Figura 7A). Obviamente el ensayo de AM verifica una tendencia positiva junto con el tratamiento en curso. Con estos resultados, será importante utilizar el ensayo de AM en un procedimiento de seguimiento con el fin de revelar el comportamiento de la tendencia del perfil de ensayo de AM en comparación con la evaluación clínica durante y mucho antes de la finalización del tratamiento con quimioterapia. Este programa de seguimiento se pone a disposición con el ensayo de AM orientado clínicamente que es simple, no invasivo y barato.

Ejemplo 8

Comparación de los perfiles de AM, a concentraciones crecientes de PSA, obtenidos para individuos sanos típicos, pacientes con cáncer de mama y donante recuperado de cáncer de mama

Hasta ahora los perfiles de AM se examinaron bajo concentraciones crecientes de glucosa que se encuentra claramente como herramienta clínica no específica general para el diagnóstico de cáncer. Con el fin de obtener una clasificación más específica del cáncer, el ensayo de AM explora simultáneamente diversos reactivos (Tabla 3), tales como los antígenos normales específicos de tejido (por ejemplo, PSA, MelanA).

El antígeno prostático específico (PSA) es una proteína normal producida por las células de la glándula prostática. El PSA es un antígeno normal específico de tejido asociado al cáncer. Este péptido es reconocido por los linfocitos T citotóxicos (CTL). El aumento de nivel en sangre periférica humana de este péptido se utiliza clínicamente como marcador bioquímico de diagnóstico del cáncer de próstata para hombres (Greene KL, et al. (2009) Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. J Urol 182(5):2232-2241). Sin embargo, se liberan bajos niveles de PSA en la circulación femenina y hasta la fecha el ensayo clínica de PSA en sangre no se utiliza como factor de diagnóstico para mujeres. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el PSA no es específico de la próstata, sino que está presente en algunos tejidos femeninos regulados por hormonas, principalmente el de mama y sus secreciones (Black MH & Diamandis EP (2000) The diagnostic and prognostic utility of prostate-specific antigen for diseases of the breast. Breast Cancer Res Treat 59(1):1-14; Black MH, et al. (2000) Serum total and free prostate-specific antigen for breast cancer diagnosis in women. Clin Cancer Res 6(2):467-473). En mujeres, el PSA se encuentra en la eyaculación femenina a una concentración aproximadamente igual a la encontrada en el semen masculino (Wimpfing F, Stifter K, Mueca W, Y Stackl W (2007) The female prostate revisited: perineal ultrasound and biochemical studies of female ejaculate. J Sex Med 4(5):1388-1393; discussion 1393). En las Figuras 8A-D se presentan tres perfiles de AM, una mujer sana típica (Figura 8B), una mujer con cáncer de mama idc en fase 2 y antes del tratamiento (Figura 8C), y una mujer recuperada del cáncer de mama en fase 2 hace 18 años (Figura 8D). Se observa que los estimulantes específicos de tejido, por ejemplo el PSA, inducen picos marcados a concentraciones óptimas en los perfiles del ensayo de AM de pacientes con cáncer (Figuras 8A-D). Tales perfiles se consideran que reflejan la estimulación mediada por el receptor específico de la enfermedad y por lo tanto permitirá detectar tumores específicos (por ejemplo, de mama por PSA, melanoma por la estimulación MelanA). Los resultados ponen de manifiesto varias cuestiones importantes. En primer lugar, el perfil de AM de mujeres sanas indica un mayor nivel de fosforilación oxidativa como ya se ha indicado anteriormente para los perfiles de AM de la glucosa (Figuras 6A-C y Figuras 7A-D). Segundo, la Figura 8C apunta a una respuesta de las CMSP al PSA por una mujer con cáncer de mama idc en fase 2, antes de cualquier tratamiento. Este perfil expresa la alta tasa de actividad metabólica en el estado "ABIERTO", ya desde el estado basal. Estos perfiles indican un alto nivel de glicólisis aerobia, un fenómeno que es similar a las células T activadas tal como se obtiene para los perfiles de AM de la glucosa de pacientes con cáncer. Otro perfil único del ensayo de AM fue puesto de manifiesto por una mujer de 50 años recuperada de cáncer de mama hace 18 años (Figura 8D). Este perfil para la estimulación PSA se comporta más como el de donante sano (Figura 8B). Además, revela una mayor tasa de AM en el estado "cerrado" que indica una vía de fosforilación oxidativa dominante a concentraciones crecientes de PSA más que el perfil característico del donante sano (Figura 8B). Este perfil tal vez está relacionado con un aumento de la población de células de memoria contra el cáncer de mama. Esta relación es consistente con la observación de que tras la eliminación de patógenos, las células efectoras que sobreviven se diferencian en células de memoria de larga vida y vuelven a un estado

metabólico oxidativo (Michalek RD & Rathmell JC (The metabolic life and times of a T-cell. Immunol Rev 236:190-202).

Ejemplo 9

5 Construcción del modelo y evaluación de la clasificación para los resultados del ensayo de AM por herramientas de minería de datos

10 Se obtienen los perfiles de AM múltiple que incluyen un gran número de valores de tasa de AM para cada donante. Con el fin de desarrollar un análisis clínico dinámico que se actualice con cada nuevo donante, y para extraer patrones de esta gran base de datos, se ha desarrollado un programa informático utilizando herramientas de minería de datos, que combina los métodos estadísticos y de inteligencia artificial con la gestión de base de datos (Nisbet R, IV JE, & Miner G (2009) Handbook of Statistical Analysis and Data Mining Applications). Se analizaron dos cohortes seleccionadas de los resultados del ensayo de AM, tanto para hombres como para mujeres. Dado que la mayoría de los pacientes con cáncer estudiados tenían más de 39 años, y con el fin de minimizar tanto como sea posible el efecto de la edad, este análisis se centró en un subgrupo de 42 donantes con una edad por encima de 40 (21 donantes sanos y 21 pacientes de cáncer). En la segunda cohorte se utilizó la serie completa de donantes de 22-81 años de edad (n = 67, 42 donantes sanos y 25 pacientes con cáncer). Para la clasificación de los donantes en personas sanas y con cáncer, se utiliza un conjunto de la familia de diez modelos diferentes, incluyendo minería de datos, aprendizaje automático y modelización estadística, aplicando el software SAS 9.3 y Clementine (v13.0). De estos diez modelos, solo cuatro fueron capaces de clasificar con la precisión más alta tanto donantes sanos como pacientes con cáncer. De los cuatro modelos, tres eran de la familia del árbol de decisiones (CHAID, C5, C&RT) y uno del modelo lineal log (regresión logística). Los cuatro se presentan en las Figuras 9A-D. Los modelos de árbol de decisiones son considerados como los mejores clasificadores, ya que estos modelos no asumen ninguna distribución ni ninguna hipótesis. El cuarto modelo que no funciona tan bien como los otros es la regresión logística. Este tipo de modelo es el más adecuado cuando los datos de entrada se comportan exactamente como los supuestos del modelo, como las suposiciones acerca de la distribución y de la independencia. Con el fin de minimizar en la medida de lo posible el sobreajuste el modelo de regresión logística se corrió utilizando el método de selección hacia adelante, lo que nos permitió ordenar las variables por importancia y minimizar en lo posible el número de variables seleccionadas. Puesto que cada modelo muestra diferentes variables/características como una función de diferentes antígenos, cada uno a diferentes concentraciones, puede ser posible combinar las predicciones presentes como una función de más de un modelo. Al examinar la influencia de los reactivos generales a diferentes concentraciones sobre la exactitud de los modelos, el número máximo de variables que fueron seleccionadas no fue superior a cinco (Figuras 9A, 9C), que se recomienda cuando el tamaño de la muestra no es suficiente para minimizar tanto como sea posible el sobreajuste. Con estos resultados iniciales fue posible ordenar los diez reactivos como predictores por su frecuencia de aparición en los diversos modelos (Figuras 9A, 9C). Actualmente es posible determinar con precisión la glucosa, MBP, rapamicina, PSA y PMA como elementos fundamentales en el ensayo de AM y en relación con el sistema inmunológico (TABLA 3). La relevancia inmunológica de los otros cinco reactivos (Tabla 3) todavía se pone de manifiesto por la elección de los modelos ocasionales. Con el fin de evaluar y comparar el rendimiento de los modelos, los presentes inventores decidieron utilizar el método gráfico que se basa en las tablas de ganancia acumulativa producidas por el software Clementine (v13.0). El gráfico de ganancia (Figuras 9B, D) contiene dos curvas incorporadas, la curva aleatoria (línea negra) y el mejor ajuste de la curva (línea azul cielo). Todos los modelos se sitúan entre estas dos curvas. En este método, una mayor área entre una curva dada y la curva aleatoria (curva negra) indica acerca de un modelo mejor. Los resultados del modelado y la clasificación de los donantes de sangre apuntan a modelos con un rendimiento similar al mejor modelo (Figuras 9A-D).

Ejemplo 10

50 Resultados del modelo de evaluación del ensayo de AM utilizando un conjunto de validación del 30 % de los donantes de sangre

A continuación se describe un proceso de partición que permite combinar y comparar modelos a fin de obtener más confianza en la precisión de los resultados del ensayo de AM, para evaluar el nivel de robustez de los modelos, y para reducir al mínimo el sobreajuste debido a la muestra de pequeño tamaño (n = 67 donaciones de muestras de sangre). Los datos como se describe en las Figuras 9A-D se repartieron al azar en dos grupos de "Formación" y "Ensayo" usando el software Clementine v13.0 9 (Figuras 10A-D). El conjunto de validación incluye el 70 % de los donantes para ambas cohortes. La primera cohorte incluye 42 donantes con una edad por encima de 40 años (Figuras 10A-B) y la segunda cohorte incluye un conjunto completo de los donantes (n = 67) de 22-81 años de edad (Figuras 10C-D). El primer 70 % de los donantes se describen en el "conjunto de Formación". El "conjunto de Formación" se utiliza para construir el modelo de minería de datos como se describe en las Figuras 9A-D. El 30 % restante de los donantes ("conjunto de Ensayo") permite evaluar el resultado de la clasificación en el "conjunto de Ensayo" usando los modelos que se generaron en el "conjunto de Formación" (CHAID, Logistic, C5, C & R Tree) (Figuras 10A-C). Los conjuntos de "Formación" y "Ensayo" permiten evaluar los resultados del modelo con mayor confianza y eliminar tanto como sea posible el desafío de sobreajuste. En ambas cohortes se comprobó que el modelo C5 dio resultados más robustos donde la curva del conjunto de "Ensayo" era similar al conjunto de

“Formación” (Figuras 10B, D). El modelo C5 fue el de mejor rendimiento en el conjunto de “Ensayo” mientras que en el conjunto de “Formación” C&RT fue el que mejor se comportó. Por estos resultados, es posible determinar con precisión la glucosa, MBP, PMA, PHA, CONA y L-glutamina como elementos fundamentales en el ensayo de AM y en relación con el sistema inmunológico (TABLA 3). Al igual que en los mejores modelos en las Figuras 9A-D, estos resultados (Figuras 10A-D) apoyan los resultados de las Figuras 9A-D.

En el presente documento se presenta un enfoque fisiológico para el diagnóstico del cáncer, apoyándose en los resultados experimentales preliminares de los perfiles de actividad metabólica obtenidos para CMSPH de pacientes sanos y con cáncer. Mediante este enfoque los presentes inventores han diseñado un método óptico sencillo de alto rendimiento, de corta duración y rentable del ensayo de AM usando CMSPH frescas extraídas de muestras de sangre de 10-20 ml. Se pusieron de manifiesto diferencias notables de los patrones de AM de las huellas digitales de CMSPH por el examen preliminar de los dos grupos clínicos, 42 individuos sanos y 25 pacientes con cáncer. Mientras que los perfiles de AM de CMSPH de los 42 donantes sanos indican una vía de la fosforilación oxidativa preferida similar, las CMSPH de los pacientes de cáncer 25 tienen un amplio espectro de perfiles de AM, prefiriendo la glicólisis aeróbica en correlación con la estadificación y el tratamiento. Uno de los casos de cáncer de tiroides y uno de los cánceres de mama fue diagnosticado por el ensayo de AM antes que los médicos. Este caso de cáncer de mama fue seguido por el ensayo de AM a lo largo de dos años como evidencia de la capacidad informativa sensible del ensayo de AM con respecto a la clasificación típica de la estadificación y los tratamientos.

Los resultados presentados en este documento alientan a una mayor exploración de la actividad metabólica de CMSPH como imagen especular del desarrollo de tumores (Figuras 9A-D). Los resultados preliminares reflejan claramente características comunes, así como específicas, de las vías metabólicas de CMSPH bajo evasión inducida por el cáncer del sistema inmunológico durante el desarrollo patológico de diferentes tumores.

Un índice diagnóstico del cáncer específico de tejido puede ser proporcionado por los perfiles del ensayo de AM en las etapas tempranas y tardías de desarrollo local del tumor por aumento (o disminución) de las tasas de AM con respecto a las observadas para donantes sanos. Deben buscarse ciertas concentraciones óptimas de antígenos específicos de tejido para los perfiles del ensayo de AM. Se esperan tales perfiles diagnósticos específicos de tejido también en las fases tempranas del desarrollo del tumor, cuando se prevé una respuesta inmune antitumoral agresiva inicial. Por este método, se puede postular que en estado sano, el sistema inmunológico se encarga de la detección precoz en curso y de la erradicación eficaz de células cancerosas en el contexto de su función normal, mediante el examen de todos los tejidos del cuerpo. Por lo tanto, se propone que el sistema inmunológico detecta y elimina células cancerosas por su excesiva expresión de antígenos normales específicos de tejido. Por lo tanto, en la homeostasis, un nivel equilibrado de respuesta inmune efectiva debe estar bien controlado, a fin de evitar una disminución de la función citolítica efectiva, o dicha actividad agresiva contra células propias normales que en su lugar podría precipitar enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, desafortunadamente, se sabe que en etapas avanzadas del cáncer el sistema inmunológico se suprime, o incluso se educa para apoyar el desarrollo del cáncer por los linfocitos infiltrantes de tumores, que pueden ser una parte de las CMSPH circulantes. En esta visión, además se prevé que en la fase metastásica letal del cáncer los perfiles del ensayo de AM de CMSPH podrían cambiar de nuevo para reflejar un estado aparentemente sano debido a la tolerancia de la inmunidad específica de tejido y anergia, a diferencia de en la inflamación crónica. Este estado saludable aparente puede estar expuesto por el agotamiento de la estimulación del antígeno específico de tejido relevante.

Ejemplo 11

Perfiles de actividad metabólica de CMSP para aumentar la concentración de glucosa obtenidos para individuos sanos típicos, donantes con cáncer y con lupus autoinmune

En homeostasis, la actividad del sistema inmunológico debe estar bien controlada; la hiperactividad se asocia a enfermedades autoinmunes, mientras que el desarrollo del cáncer relacionado está probablemente con la hipoactividad del sistema inmunológico.

Se obtuvieron perfiles de AM significativamente diferentes para aumentar la concentración de glucosa obtenida para individuos sanos típicos, donantes con cáncer y con lupus autoinmune (Figura 13).

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán obvias para los expertos en la técnica. En consecuencia, se pretende abarcar todas estas alternativas, modificaciones y variaciones que caen dentro del espíritu y el alcance amplio de las reivindicaciones adjuntas.

Además, la cita o identificación de cualquier referencia en esta solicitud no se interpretará como una admisión de que tal referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención. En la medida en que se utilicen títulos de las secciones, no deben interpretarse como necesariamente limitantes.

Referencias

(a lo largo de la solicitud se enumeran otras referencias)

- 5 1. Bassani-Sternberg, M. et al. Feature Article: Soluble plasma HLA peptidome as a potential source for cancer biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
2. Hayden, E. C. Personalized cancer therapy gets closer. *Nature* 458, 131-2 (2009).
3. Kawakami, Y. et al. Identification of human tumor antigens and its implications for diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Sci* 95, 784-91 (2004).
- 10 4. Robins, H. S. et al. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci Transl Med* 2, 47ra64 (2010).
5. Early warnings. *Nature* 458, 679 (2009).
6. Sawyers, C. L. The cancer biomarker problem. *Nature* 452, 548-52 (2008).
7. Luebeck, E. G. Cancer: Genomic evolution of metastasis. *Nature* 467, 1053-5.
- 15 8. Rosenberg, S. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 21, 233-40 (2009).
9. Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A. & Dudley, M. E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 8, 299-308 (2008).
10. Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N. & Zitvogel, L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 9, 486-94 (2008).
- 20 11. An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination. *Womens Health (Lond Engl)* 6, 493.
12. Alexander-Miller, M. A. High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol Res* 31, 13-24 (2005).
- 25 13. Michalek, R. D. & Rathmell, J. C. The metabolic life and times of a T-cell. *Immunol Rev* 236, 190-202.
14. Maciver, N. J. et al. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol* 84, 949-57 (2008).
15. Zhang, Q. Y. et al. Myelin-basic protein-reactive specific CD4+ and CD8+ NK lymphocytes induce morphological changes in neuronal cell bodies and myelin sheaths: implications for multiple sclerosis. *Arch Med Res* 39, 45-51 (2008).
- 30 16. Narita, D., Cimpean, A. M., Anghel, A. & Raica, M. Prostate-specific antigen value as a marker in breast cancer. *Neoplasma* 53, 161-7 (2006).
17. Bromley, S. K., Mempel, T. R. & Luster, A. D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 9, 970-80 (2008).
- 35 18. Kaelin, W. G., Jr. & Thompson, C. B. Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465, 562-4.
19. Fox, C. J., Hammerman, P. S. & Thompson, C. B. Fuel feeds function: energy metabolism and the T-cell response. *Nat Rev Immunol* 5, 844-52 (2005).
20. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-33 (2009).
- 40 21. Nisbet, R., IV, J. E. & Miner, G. *Handbook of Statistical Analysis and Data Mining Applications* (ed. Material, C.) (2009).
22. Patolsky, F. et al. Electrical detection of single viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14017-22 (2004).
23. Zheng, G., Patolsky, F., Cui, Y., Wang, W. U. & Lieber, C. M. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat Biotechnol* 23, 1294-301 (2005).
- 45 24. Hakonen, A. & Hulth, S. A high-precision ratiometric fluorosensor for pH: implementing time-dependent non-linear calibration protocols for drift compensation. *Anal Chim Acta* 606, 63-71 (2008).

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir una actividad metabólica (AM) de una célula, comprendiendo el método la medición de manera independiente en un entorno extracelular de la célula, los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de dichos perfiles de acidificación dependientes del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de la célula.

2. Un método ex vivo para diagnosticar una enfermedad asociada con una actividad metabólica modificada en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método:

medir de manera independiente en un entorno extracelular de una célula los perfiles de acidificación dependientes del tiempo de dicho sujeto debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de dichos perfiles de acidificación dependientes del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de dicha célula y mientras que un cambio en dicha actividad metabólica en comparación con la de una muestra de células normales no afectadas examinadas en condiciones idénticas es indicativo de una enfermedad asociada con la actividad metabólica modificada.

3. Un método ex vivo de optimización del tratamiento de la enfermedad, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto que comprende una célula con al menos un medicamento;
- (b) medir de manera independiente en un entorno extracelular de dicha célula los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de dichos perfiles de acidificación dependientes del tiempo es indicativo de la actividad metabólica de dicha célula y mientras que un cambio en dicha actividad metabólica de dichas células hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas es indicativo de un medicamento eficaz para dicha enfermedad.

4. Un método ex vivo de seguimiento del tratamiento de la enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método:

medir de manera independiente en un entorno extracelular de una célula de un sujeto tratado los perfiles de acidificación dependientes del tiempo debido a la secreción de:

- (i) productos metabólicos solubles no volátiles;
- (ii) productos metabólicos solubles no volátiles y productos metabólicos solubles volátiles; y
- (iii) productos metabólicos solubles volátiles;

en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (i) se efectúa en una cámara expuesta al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (ii) se efectúa en una cámara sellada al aire, y en el que dicha medición del perfil de acidificación de dicho (iii) se realiza restando un perfil de acidificación de dicho (i) de un perfil de acidificación de dicho (ii), y además en el que al menos uno de dichos perfiles de acidificación dependientes del

tiempo es indicativo de la actividad metabólica de dicha célula y mientras que un cambio en dicha actividad metabólica de dichas células hacia la de una muestra celular sana normal examinada en condiciones idénticas es indicativo de un tratamiento eficaz de dicha enfermedad.

- 5 5. Un método ex vivo para identificar un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células, comprendiendo el método:
- (a) someter las células a un agente;
 - (b) medir la actividad metabólica de las células después de (a) y opcionalmente antes de (a) de acuerdo con el
- 10 método de la reivindicación 1, en el que un cambio en dichos perfiles de acidificación es indicativo de un agente capaz de alterar una actividad metabólica de las células.
6. El método de la reivindicación 1-5, en el que dicho entorno extracelular comprende una solución definida que tiene una capacidad tamponante calibrada y, opcionalmente, en el que dicho tampón comprende una solución salina
- 15 tamponada con fosfato.
7. El método de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha célula comprende una célula inmunológica no patógena y, opcionalmente, en el que dicha célula inmunológica no patógena es un leucocito, opcionalmente una célula mononuclear de sangre periférica y, opcionalmente, un linfocito.
- 20 8. El método de las reivindicaciones 1-5, en el que dichas células comprenden una célula cancerosa.
9. El método de las reivindicaciones 2-4, en el que dicha enfermedad comprende cáncer.
- 25 10. El método de la reivindicación 9, en el que dicha muestra biológica comprende una muestra de sangre.
11. Los métodos de la reivindicación 1-5, caracterizados por que dichos metabolitos no volátiles comprenden lactato.
12. Los métodos de la reivindicación 1-5, caracterizados porque dichos metabolitos volátiles comprenden NH_3 y CO_2 .
- 30 13. Los métodos de las reivindicaciones 1-5, que además comprenden someter dicha célula a un estimulante o inhibidor antes de, o simultáneamente con, la medición de dicho perfil de acidificación.
14. Los métodos de las reivindicaciones 1-13, que comprenden además la separación de dicha célula a partir de dicho entorno extracelular y, opcionalmente, en los que dicha separación es mediante separación con Ficoll bajo
- 35 centrifugación.

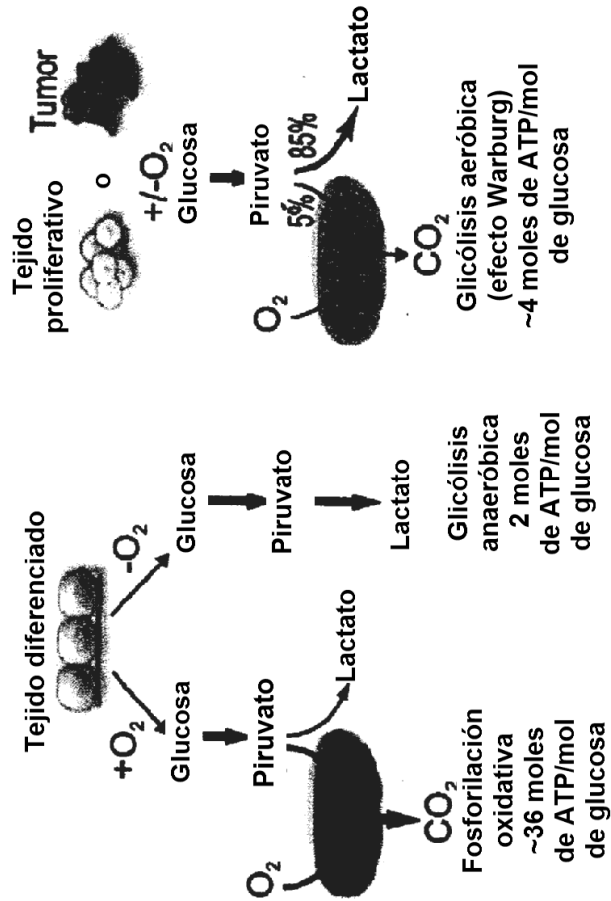


FIG. 1

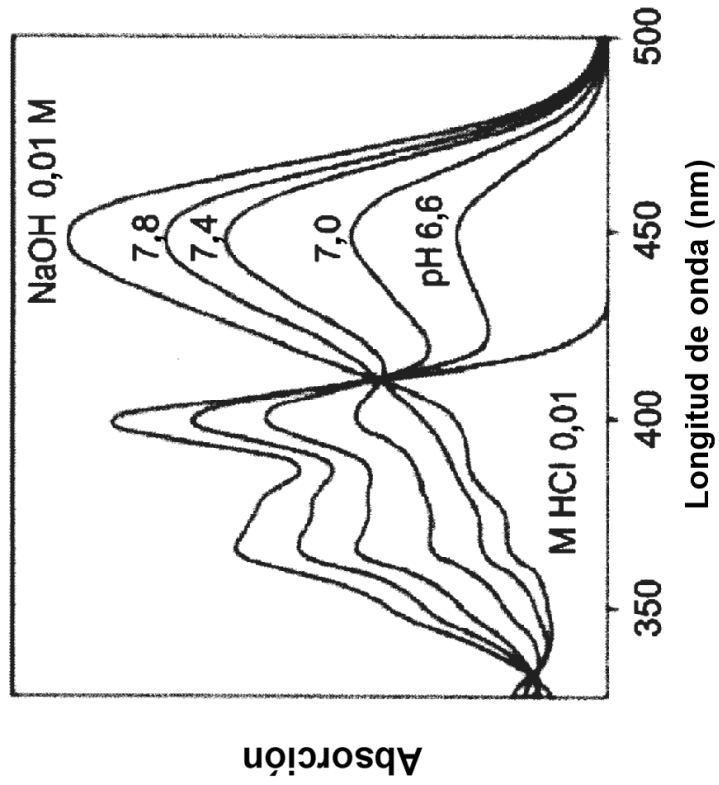


FIG. 2

FIG. 3A

ABIERTO; Tampón fosfato 2 mM

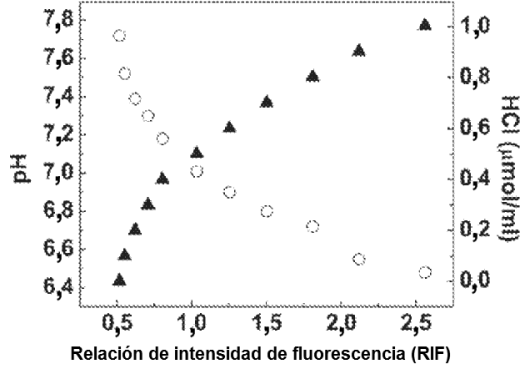


FIG. 3B

CERRADO; Tampón fosfato 2 mM

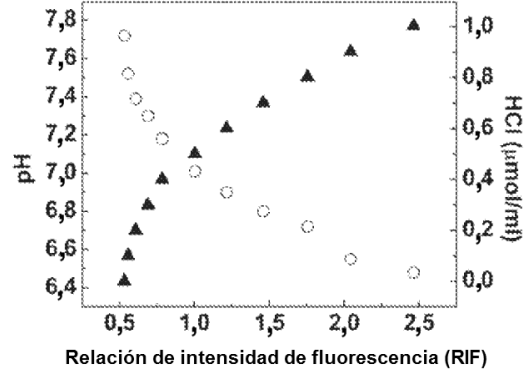


FIG. 3C

ABIERTO; Tampón fosfato 10 mM

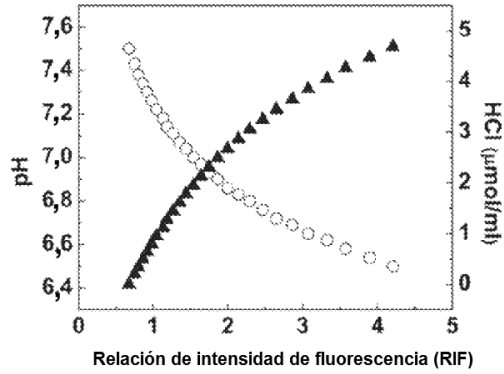


FIG. 3D

CERRADO; Tampón fosfato 10 mM

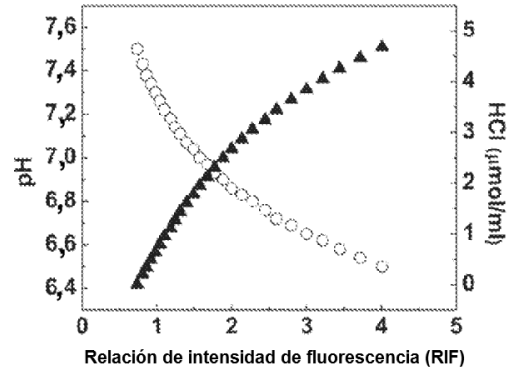


FIG. 4A

HPTS 1 μM ; Tampón fosfato 10 mM

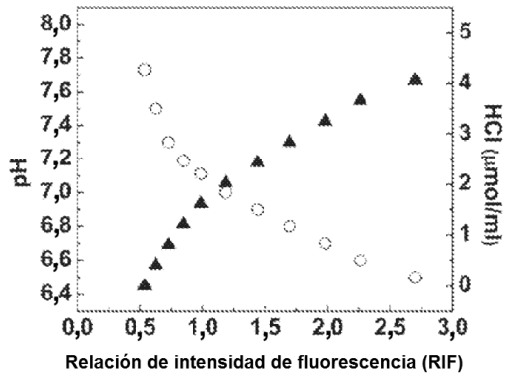
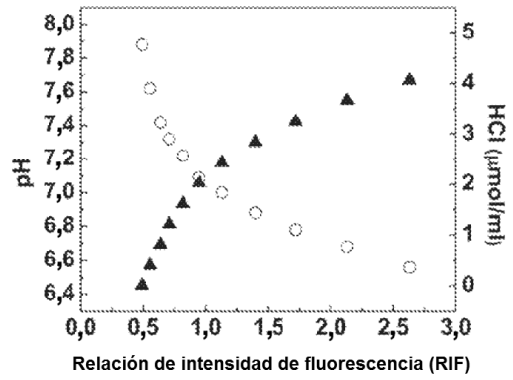


FIG. 4B

HPTS 10 μM ; Tampón fosfato 10 mM



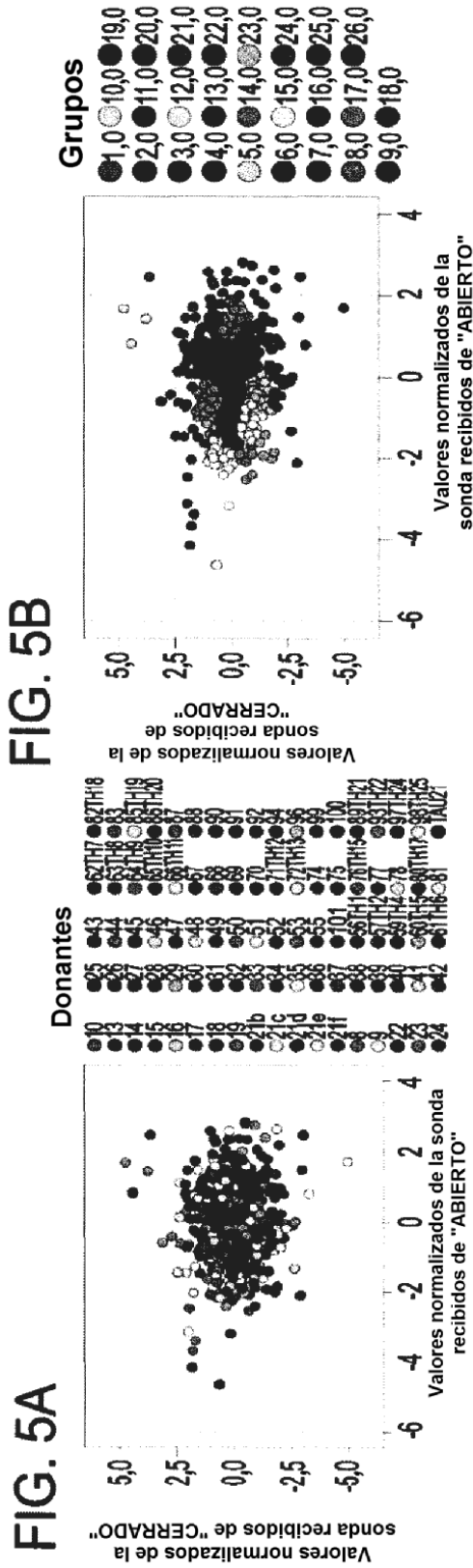


FIG. 5B

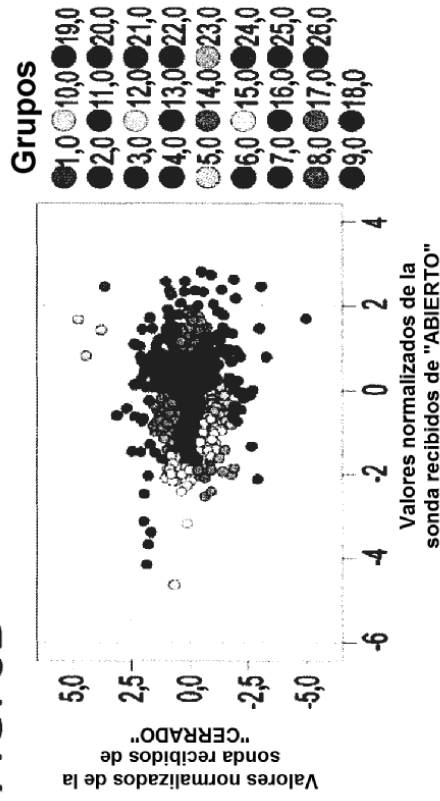


FIG. 5C

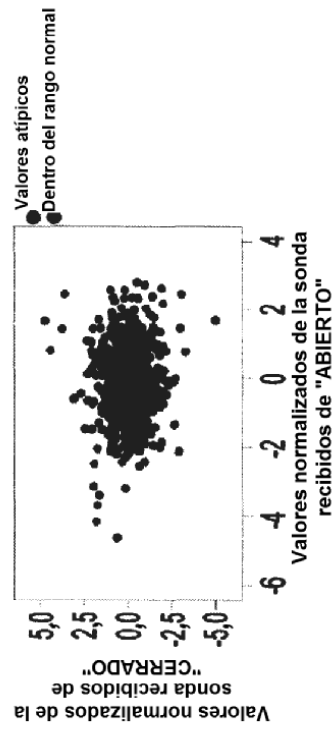


FIG. 5D

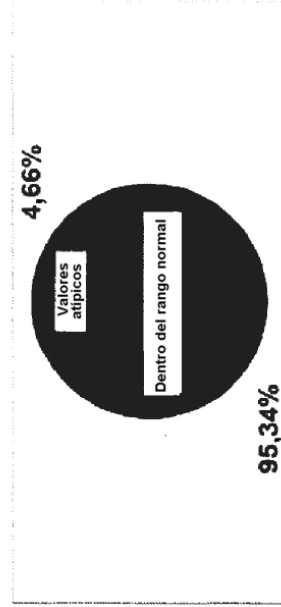


FIG. 6A

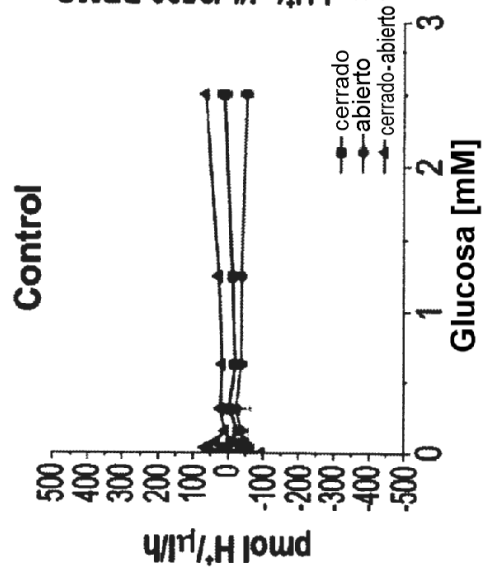


FIG. 6B

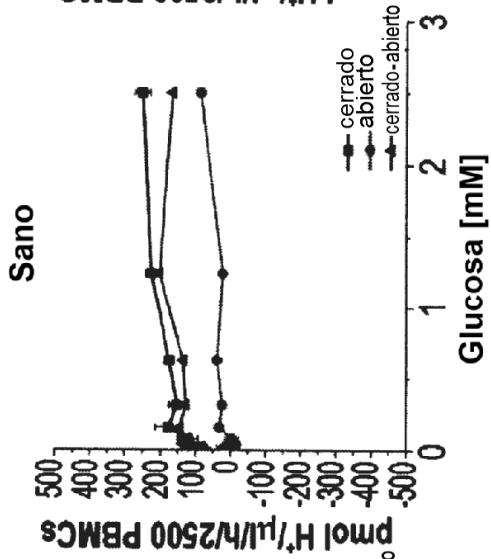


FIG. 6C

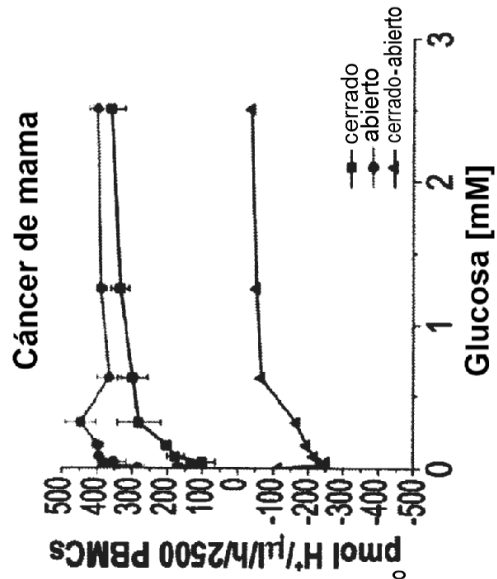


FIG. 7A

Sano

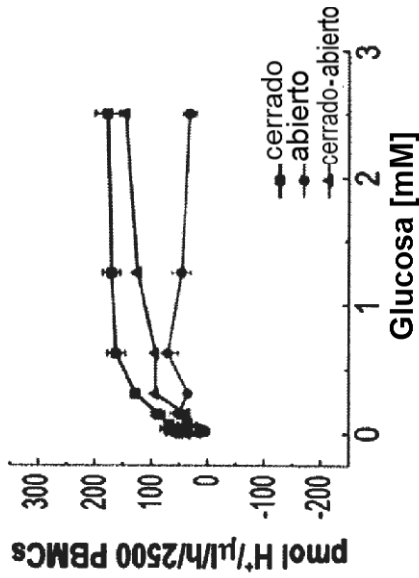


FIG. 7B

Cáncer de mama (tiempo = 0)

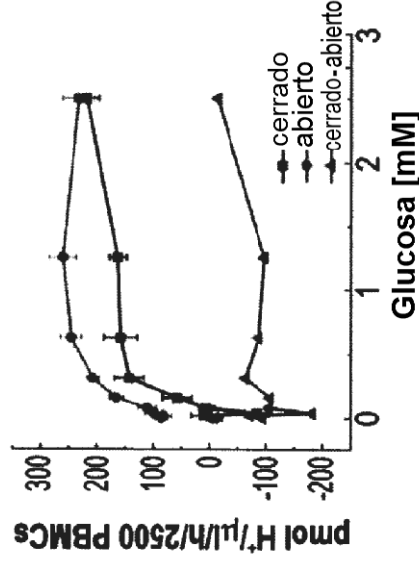


FIG. 7C

Cáncer de mama (tiempo = (+) 10,5 meses)

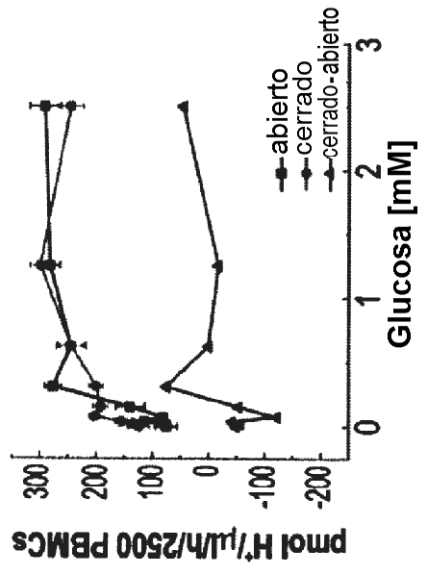


FIG. 7D

Cáncer de mama (tiempo = (+) 14,5 meses)

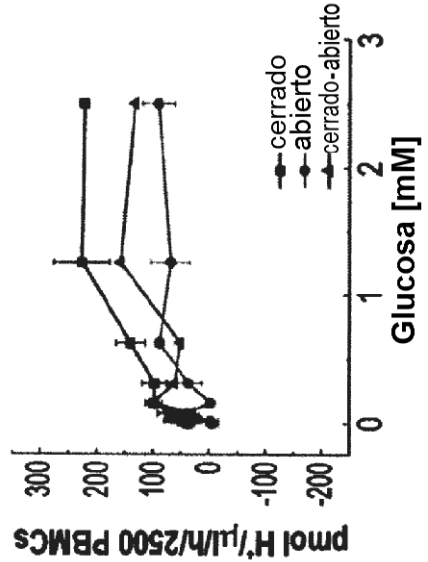


FIG. 8A

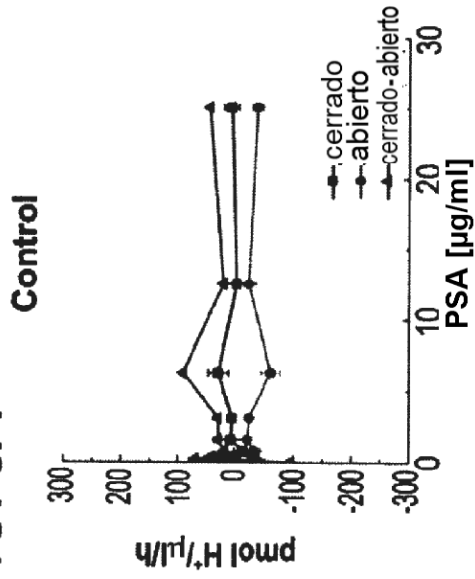


FIG. 8B

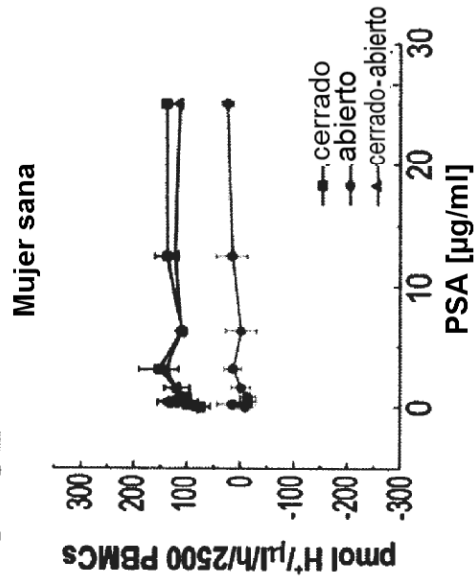


FIG. 8C

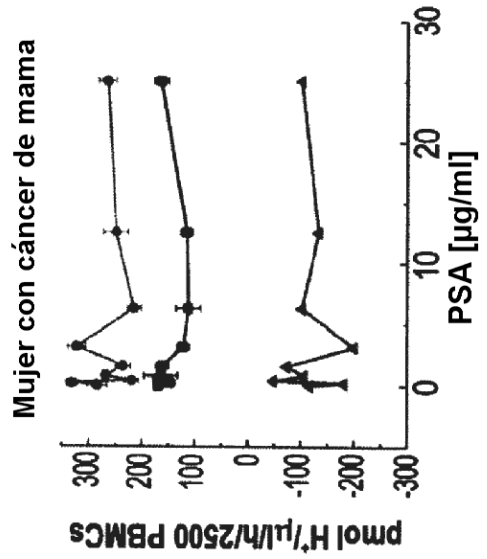


FIG. 8D

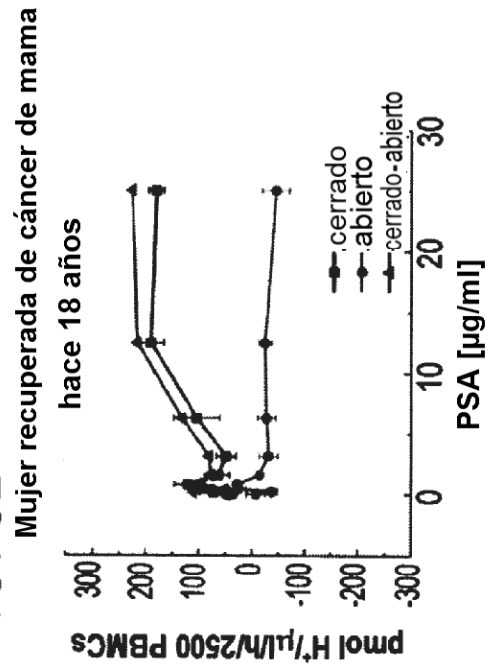


FIG. 9A

Tipo de modelo	Variables importantes	Resultados de clasificación	Evaluación del modelo
CHAID	Rapamicina[4,1mM] (°C-O°) 57<Edad≤57 Glucosa [0,312mM] (°C-O°)	Sano; 21 de 21 Cáncer; 21 de 21	TP=0 TN=0 FN=0 FP=0 Sensibilidad: 100% Especificidad: 100%
C5	Glucosa [1,25mM] (°C) Glucosa [0,312mM] (°C-O°) PSA [1,562µg/ml] (°O°) MBP [0,195µg/ml] (°O°)	Sano; 20 de 21 Cáncer; 21 de 21	TP=21 TN=20 FN=0 FP=1 Sensibilidad: 100% Especificidad: 95%
C&R TREE	Glucosa [0,312mM] (°C-O°) MelanA [0,125µg/ml] (°C) MBP [12,5µg/ml] (°O°) PHA [0,39µg/ml] (°C°) PSA [25µg/ml] (°C)	Sano; 21 de 21 Cáncer; 21 de 21	TP=0 TN=0 FN=0 FP=0 Sensibilidad: 100% Especificidad: 100%
Logístico	Glucosa [0,039mM] (°C-O°) Rapamicina [1,25mM] (°C) LES [1ng/ml] (°C°)	Sano; 21 de 21 Cáncer; 15 de 16* <small>* Se eliminaron 5 pacientes por regresión logística de la modelización debido a la ausencia de valores</small>	TP=15 TN=21 FN=1 FP=0 Sensibilidad: 94% Especificidad: 100%

FIG. 9B

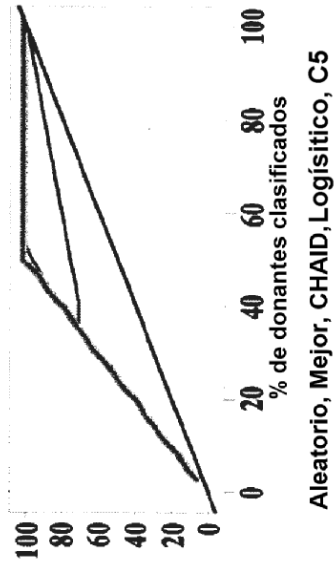


FIG. 9D

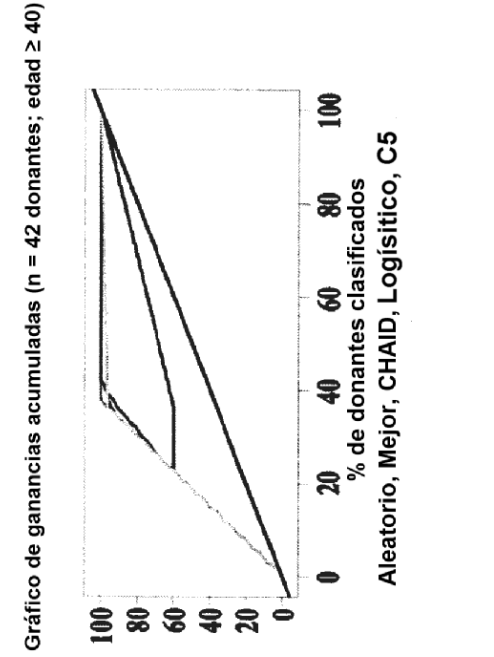


FIG. 9C

Tipo de modelo	Variables importantes	Resultados de clasificación	Evaluación del modelo
CHAID	COMA [3,125µg/ml] (°O°) PMA [0,5ng/ml] (°C°) MBP [3,125µg/ml] (°O°) MBP [1,562µg/ml] (°C) MBP [0,195µg/ml] (°C-O°)	Sano; 39 de 42 Cáncer; 25 de 25	TP=25 TN=39 FN=0 FP=3 Sensibilidad: 100% Especificidad: 93%
C5	Glucosa [1,25mM] (°C) PMA [0,015ng/ml] (°C-O°) Glucosa [0,039mM] (°O°) PMA [0,5ng/ml] (°C°) LES [0,082mM] (°O°)	Sano; 41 de 42 Cáncer; 24 de 25	TP=24 TN=41 FN=1 FP=1 Sensibilidad: 96% Especificidad: 98%
C&R TREE	PMA [0,015ng/ml] (°C) Glucosa [0,039mM] (°O°) Rapamicina [4,15mM] (°C-O°) MBP [0,195µg/ml] (°C) Rapamicina [1,25mM] (°C)	Sano; 42 de 42 Cáncer; 24 de 25	TP=24 TN=42 FN=1 FP=0 Sensibilidad: 96% Especificidad: 100%
Logístico	Edad Glucosa [0,312mM] (°O°) PHA [0,78µg/ml] (°C°) MBP [0,39µg/ml] (°O°) MBP [12,5µg/ml] (°O°) MelanA [0,031µg/ml] (°C-O°)	Sano; 41 de 41* Cáncer; 15 de 18* <small>* se eliminaron 8 pacientes por regresión logística de la modelización debido a la ausencia de valores</small>	TP=15 TN=41 FN=3 FP=0 Sensibilidad: 83% Especificidad: 100%

FIG. 9D

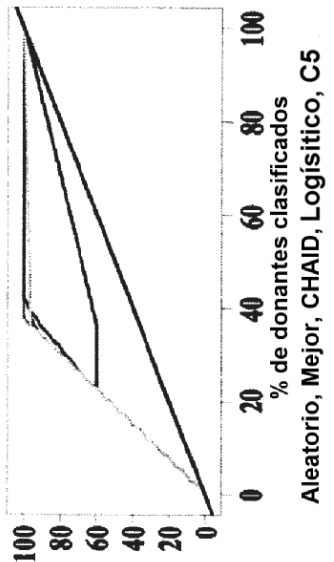


FIG. 10A

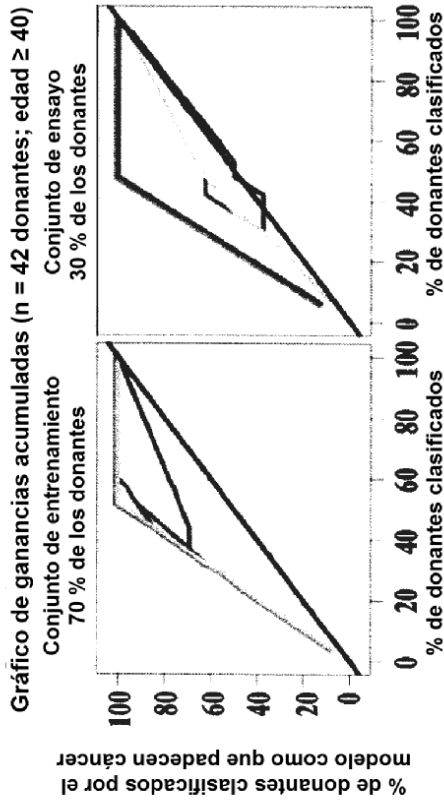


FIG. 10B

Mejor modelo después del reparto aleatorio de datos (edad ≥ 40)	C5
VARIABLES IMPORTANTES	Glucosa [0,312mM] ("C") MBP [0,195µg/ml] ("O") PHA [3,125µg/ml] ("C")
Clasificación de resultados	Sano: 9 de 9 Cáncer: 7 de 8
Evaluación del modelo	TP=7 TN=9 FN=1 FP=0 Sensibilidad: 88% Especificidad: 100%

Aleatorio, Mejor, CHAID, Logístico, C5,

FIG. 10C

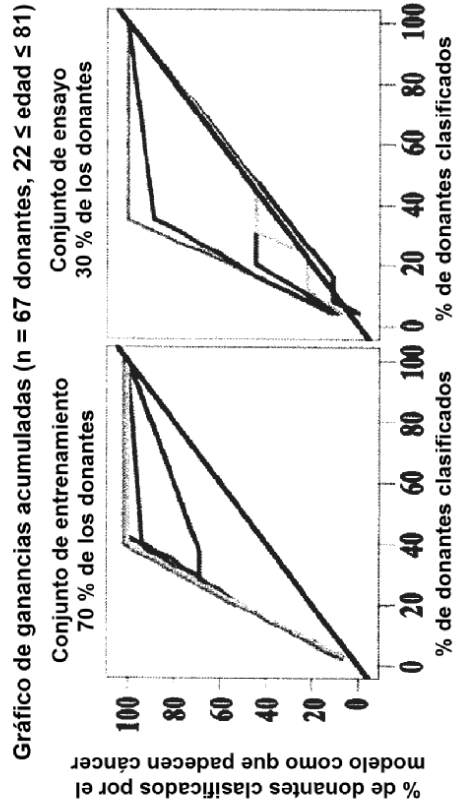
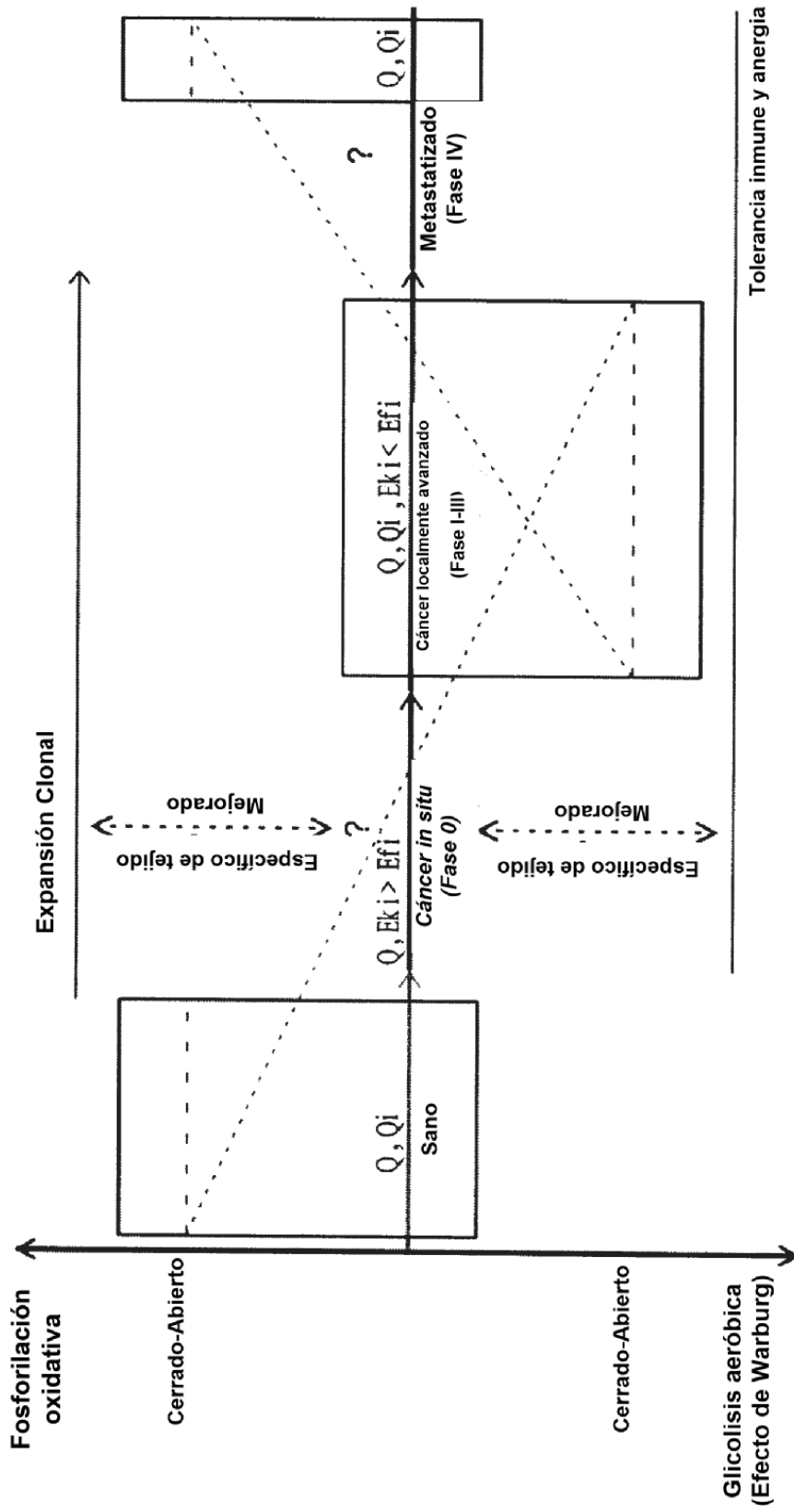


FIG. 10D

Mejor modelo después del reparto aleatorio de datos (22 ≤ edad ≤ 81)	C5
VARIABLES IMPORTANTES	Glucosa [1,25mM] ("C") L-glutamina [2mM] ("C") PMA [0,5ng/ml] ("C") CONA [25µg/ml] ("C")
Clasificación de resultados	Sano: 16 de 17 Cáncer: 7 de 9
Evaluación del modelo	TP=7 TN=16 FN=2 FP=1 Sensibilidad: 78% Especificidad: 4%

Aleatorio, Mejor, CHAID, Logístico, C5,



Q - Células quiescentes, Ek - células asesinas efectoras antitumorales, Ef - Células alimentadoras efectoras protumorales, i - subgrupo específico de tejido

FIG. 11

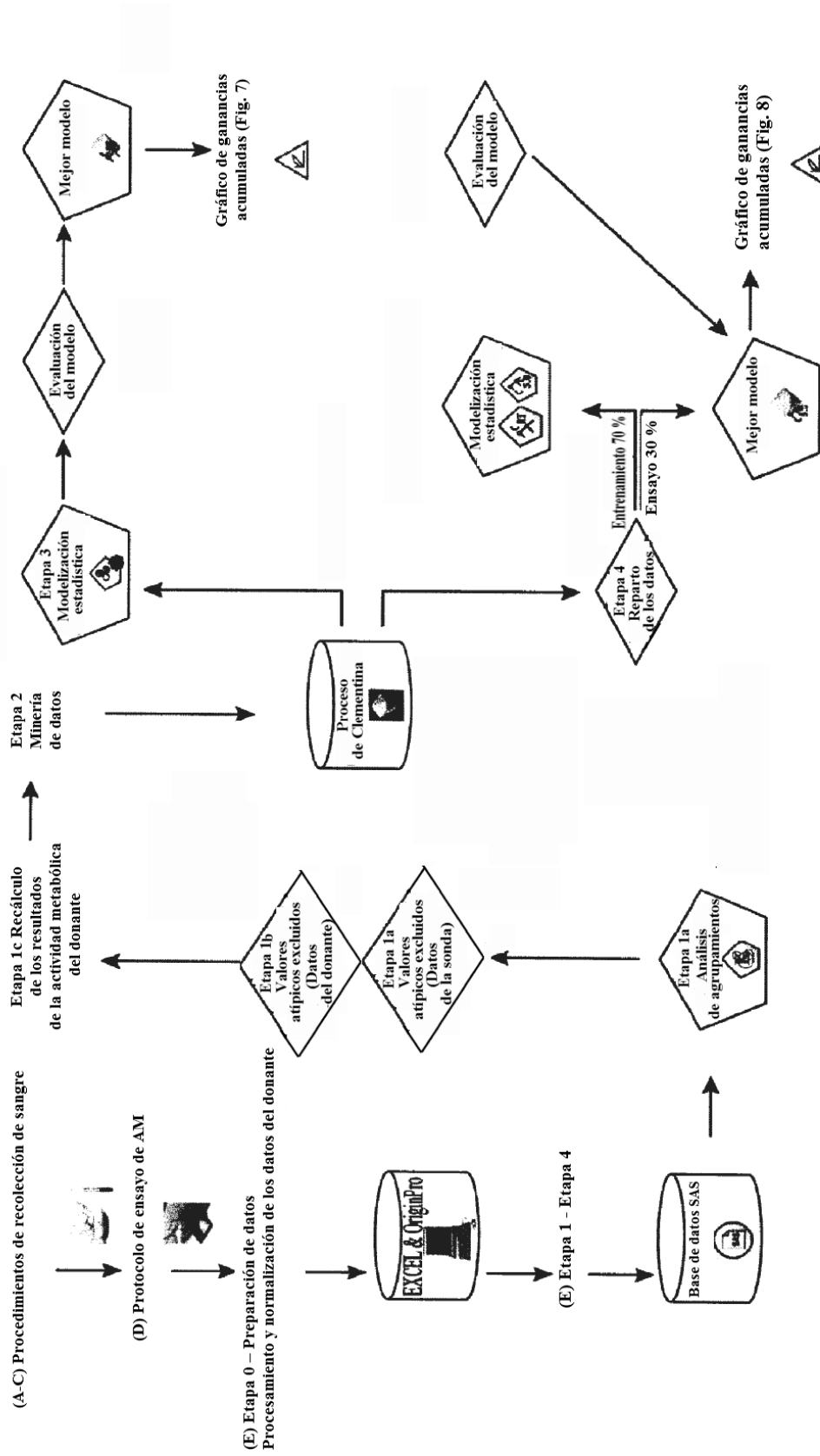


FIG. 12

