

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 909**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2010 PCT/US2010/042182**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008990**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2010 E 10800567 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2454598**

54 Título: **Selección de fármacos para el tratamiento del cáncer gástrico usando matrices basadas en anticuerpos**

30 Prioridad:

15.07.2009 US 225866 P

30.11.2009 US 265218 P

16.04.2010 US 325000 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

DIATECH HOLDINGS, INC. (100.0%)

405 Duke Drive, Suite 240

Franklin, TN 37067 , US

72 Inventor/es:

SINGH, SHARAT;

KIM, PHILLIP;

LIU, XINJUN y

YBARRONDO, BELEN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 627 909 T3

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

DESCRIPCIÓN

Selección de fármacos para el tratamiento del cáncer gástrico usando matrices basadas en anticuerpos

5 **Antecedentes de la invención**

Una gran variedad de neoplasias malignas humanas muestra estimulación, sobreexpresión o mutación de c-Met sostenida, incluyendo carcinomas de mama, hígado, pulmón, ovario, riñón, estómago (gástrico) y tiroides. De manera destacable, se han identificado positivamente mutaciones activantes en c-Met en pacientes con una forma hereditaria particular de cáncer renal papilar, lo que implica directamente a c-Met en la tumorigénesis humana. La señalización aberrante de la vía de señalización de c-Met debida a la desregulación del receptor c-Met o a la sobreexpresión de su ligando, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), se ha asociado con un fenotipo agresivo. Una gran cantidad de pruebas acerca de que la señalización de c-Met está implicada en la progresión y diseminación de varios cánceres y una mejor comprensión de su papel en la enfermedad han generado un interés considerable en c-Met y HGF como dianas principales en el desarrollo de fármacos para el cáncer. Hofmann et al., Molecular cancer therapeutics, vol. 7, n.º 11, 1 de noviembre 2008, páginas 3499-3508, demuestra que la inhibición de MET induce una detención completa del crecimiento de células de cáncer gástrico amplificadas por MET pero deja a las células malignas vulnerables a la activación colateral de MEK/MAPK y/o PI3K/AKT mediada por receptor de factor de crecimiento, lo que sugiere un mecanismo de escape potencial frente a la inhibición de MET.

El documento EP2065475 se refiere a un método para predecir la terapia en tumores que tienen irregularidades en la expresión de al menos un ligando de VEGF y/o al menos un receptor ErbB.

El documento WO2006045991 se refiere a un método de terapia personalizada para el cáncer que emplea un método para clasificar un tumor para predecir si un paciente responderá a un agente quimioterapéutico y a un kit para su uso en el método.

Este interés ha desembocado en el desarrollo de una serie de antagonistas de la vía de c-Met con aplicaciones clínicas potenciales. Las tres estrategias principales para el desarrollo de fármacos anticáncer selectivos para una vía han incluido el antagonismo de la interacción ligando/receptor, la inhibición de la actividad catalítica de tirosina cinasa y el bloqueo de la interacción de receptor/efector.

c-Met es el receptor de superficie celular para el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), también conocido como factor de dispersión. El HGF es una glucoproteína multidominio que está altamente relacionada con miembros de la familia de serina proteasa de plasminógeno. Se secreta en forma de un polipéptido monocatenario inactivo por parte de las células mesenquimales y se escinde en su heterodímero activo mediante una serie de proteasas.

La unión de HGF induce la homodimerización del receptor c-Met y la fosforilación de dos restos de tirosina (Y1234 e Y1235) en el sitio catalítico, regulando la actividad cinasa. La cola carboxilo-terminal incluye las tirosinas Y1349 e Y1356, que, cuando se fosforilan, sirven como sitios de acoplamiento para proteínas adaptadoras intracelulares, originando una señalización aguas abajo. El receptor c-Met se expresa en las células epiteliales de muchos órganos durante la embriogénesis y la edad adulta, incluyendo el hígado, páncreas, próstata, riñón, músculo y médula ósea.

Un cáncer mediado por c-Met de interés es el cáncer gástrico. El cáncer gástrico es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo, con una incidencia de 18,9/100.000 cada año. Se ha estimado la incidencia del cáncer gástrico en 934.000 casos, produciéndose un 56% de los nuevos casos en Asia oriental. El cáncer gástrico supone el 20,8% de todos los cánceres en Corea según los datos del Registro Central de Tumores para el año 2002. Aunque la gastrectomía es el único tratamiento curativo para los pacientes de cáncer gástrico, una alta tasa de recurrencia del 40 ~ 60% después de la cirugía curativa sigue siendo la responsable de la escasa supervivencia general.

Los resultados clínicos preliminares de varios antagonistas de c-Met se encuentran en investigación clínica en la actualidad. Estos agentes, incluyendo anticuerpos monoclonales, disruptores de las interacciones de ligando/receptor e inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña, han sido prometedores. También se encuentran en investigación clínica y son prometedoras varias terapias dirigidas a múltiples dianas, en particular, respecto de la inhibición de tirosina cinasa. En vista del papel que desempeña c-Met en una serie de cánceres, existe la necesidad de una selección adecuada y de estrategias de terapias para un individuo. Esto es especialmente cierto para cánceres gástricos mediados por c-Met. La presente invención satisface estas y otras necesidades.

60 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona composiciones y métodos para detectar el estado (por ejemplo, expresión y/o niveles de activación) de componentes de las vías de transducción de señales en células tumorales (por ejemplo, células de tumores gástricos). La información acerca de la expresión y/o los estados de activación de los componentes de las vías de transducción de señales (por ejemplo, componentes de las vías de transducción de

señales de HER2 y/o c-Met) obtenida mediante la práctica de la presente invención puede usarse para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer gástrico y en el diseño de tratamientos para el cáncer gástrico.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar o predecir la respuesta de un cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer o para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer gástrico, comprendiendo el método:

10 (a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de HER1 solo o de HER1 en combinación con uno o más analitos seleccionados entre el grupo que consiste en HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en un extracto celular producido a partir de una célula de cáncer aislada; y

15 (b) identificar o predecir la respuesta del cáncer gástrico o seleccionar un fármaco anticáncer adecuado basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de dichos uno o más analitos determinados en la etapa (a).

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que se calibra el nivel de expresión y/o el nivel de activación de dichos uno o más analitos frente a una curva patrón generada para dichos uno o más analitos. En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior, en donde la célula cancerosa se aísla de un sujeto que tiene el cáncer gástrico tras haber administrado un fármaco anticáncer. En una realización, se pone en contacto la célula cancerosa aislada con un fármaco anticáncer. En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior, en el que se identifica o predice la respuesta del cáncer gástrico o se selecciona el fármaco anticáncer adecuado comparando el nivel de expresión y/o el nivel de activación de dichos uno o más analitos respecto de un perfil de expresión y/o activación de referencia de dichos uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que el cáncer gástrico es un adenocarcinoma o en el que el cáncer gástrico ha metastatizado al esófago, el intestino delgado, los nódulos linfáticos, órganos, hueso o combinaciones de los mismos.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que dichos uno o más analitos comprenden HER2, HER3, c-Met, IGF1R, PI3K. En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la célula cancerosa es una célula tumoral circulante o una célula de un aspirado con aguja fina (FNA) obtenida de un tumor, preferentemente un tumor gástrico.

35 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la célula cancerosa se obtiene de una muestra, preferentemente, de una muestra obtenida de un sujeto con cáncer gástrico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la célula aislada se estimula *in vitro* con uno o más factores de crecimiento.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que el fármaco anticáncer se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, inhibidor de tirosina cinasa, agente antiproliferativo, agente quimioterapéutico y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], que además comprende determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos adicionales en el extracto celular, en el que los uno o más analitos adicionales comprenden

45 (i) una o más moléculas de transducción de señales seleccionadas entre el grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos; o

50 (ii) una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en HER4, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, GSK-3 β , Raf, SRC, NF κ B-I κ B, mTOR, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, Flt-3, Tie-1, Tie-2, cFMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON y combinaciones de los mismos.

55 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la determinación del nivel de expresión de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende detectar un nivel total de dichos uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para dichos uno o más analitos.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la determinación del nivel de activación de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende detectar un nivel de fosforilación de dichos uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para una forma fosforilada de dichos uno o más analitos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la determinación del nivel de expresión de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende:

65 (i) incubar el extracto celular con una dilución en serie de anticuerpos de captura específicos para dichos uno o más analitos de una diversidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un

soporte sólido;

(ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para dichos uno o más analitos para formar una diversidad de analitos detectables capturados, en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

(iii) incubar la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el método anterior descrito en el párrafo [0008], en el que la determinación del nivel de activación de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende:

(i) incubar el extracto celular con una dilución en serie de anticuerpos de captura específicos para dichos uno o más analitos de una diversidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido;

(ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para dichos uno o más analitos para formar una diversidad de analitos detectables capturados, en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

(iii) incubar la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

[0010-0020] eliminados

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y figuras.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un ejemplo de una vía de transducción de señales implicada en la proliferación celular que puede usarse en la práctica de la invención. Se representan los componentes de la vía de EGFR/MAPK/ERK que se usan por las células para convertir una señal mitogénica en proliferación celular.

La figura 2 muestra esquemáticamente la aplicación de las disposiciones abordables de la invención para la selección de fármacos a lo largo del tratamiento de un cáncer.

La figura 3 muestra los niveles de activación de c-Met y HER2 en células de carcinoma epidermoide A431 tratadas con HGF.

La figura 4 muestra los niveles de activación de c-Met y HER2 en células de cáncer de pulmón HCC827 tratadas con HGF.

La figura 5 muestra una realización del formato de ensayo de proximidad de la invención (COPIA), que está basado en la co-localización de dos anticuerpos detectores adicionales enlazados con enzimas para eventos de canalización posteriores para cada proteína diana unida.

La figura 6 muestra un ejemplo esquemático de una matriz abordable que comprende diluciones de anticuerpos para componentes de vías de tirosina cinasas receptoras, tales como aquellas en las vías de c-Met y EGFR/MAPK/ERK. Como ejemplo no limitante, los anticuerpos pueden emplacarse por triplicado en cuatro diluciones diferentes en la matriz abordable.

La figura 7 muestra un ejemplo esquemático de una matriz abordable que comprende diluciones de anticuerpos para componentes de vías de transducción de señales activadas en el cáncer gástrico. Como ejemplo no limitante, los anticuerpos pueden emplacarse por triplicado en cuatro diluciones diferentes en la matriz abordable.

La figura 8 muestra otra realización del formato de ensayo de proximidad de la invención (COPIA), que es particularmente útil al determinar los niveles de analito activado (por ejemplo, fosforilado) y total en una muestra

biológica.

La figura 9 muestra curvas de titulación estándar generadas para la cuantificación de HER2.

5 **La figura 10A** muestra una comparación del perfil diferencial de HER2 (con capturas de ECD de HER2 e ICD de HER2) de células BT474 con y sin la eliminación de HER2 de longitud completa. **La figura 10B** muestra la cuantificación de la expresión y fosforilación de la proteína diana basándose en líneas celulares con niveles de expresión de RTK conocidos tratados con ligandos específicos para cada RTK.

10 **La figura 11** muestra que se observó una gran variedad de expresión de proteínas de la vía en muestras de GCA. "T" = Total; "P" = fosforilada.

La figura 12 muestra el número de CTC obtenidos en un volumen de sangre específico de pacientes de GCA según se determina mediante el sistema de enumeración Veridex CTC.

15 **La figura 13** muestra la expresión y la activación de HER1/EGFR y de HER2 en CTC aislados de pacientes de GCA determinado mediante COPIA.

20 **La figura 14** muestra el grado de correlación entre inmunohistoquímica (IHC) y COPIA para detectar la expresión de HER2 en tejido tumoral de GCA.

La figura 15 muestra que se observó una gran variedad de expresión de proteínas de la vía en muestras de GCA. Los analitos ensayados mediante COPIA incluyeron las siguientes proteínas de vía de transducción de señales: HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc. N = 291.

25 **La figura 16** muestra los análisis COPIA de los niveles de expresión de HER2, HER3, c-Met, IGF1R y cKit y los niveles de activación de PI3K en tejido tumoral de GCA a dos concentraciones de lisado tumoral diferentes.

30 **La figura 17** muestra el perfil de expresión de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc en muestras de tejido tumoral de GCA usando COPIA. Se usaron IgG y citoqueratina (CK) como controles y se ensayaron los niveles de expresión de HER1 con dos anticuerpos de captura diferentes (denominados "HER1" y "HER1-2"). También se muestra la cantidad de lisado tumoral (es decir, 0,25 µg, 2,5 µg, 20 µg).

35 **La figura 18** muestra el perfil de expresión de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc en muestras adicionales de tejido tumoral de GCA usando COPIA. Se usaron IgG y CK como controles y se ensayaron los niveles de expresión de HER1 con dos anticuerpos de captura diferentes (denominados "HER1" y "HER1-2"). También se muestra la cantidad de lisado tumoral (es decir, 0,25 µg, 2,5 µg, 20 µg).

40 **La figura 19** muestra el perfil de expresión de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc en muestras adicionales de tejido tumoral de GCA usando COPIA. Se usaron IgG y CK como controles y se ensayaron los niveles de expresión de HER1 con dos anticuerpos de captura diferentes (denominados "HER1" y "HER1-2"). También se muestra la cantidad de lisado tumoral (es decir, 0,25 µg, 2,5 µg, 20 µg).

45 **La figura 20** muestra el nivel de expresión de p95HER2 en muestras de tejido tumoral de GCA determinados mediante COPIA (por ejemplo, usando el ensayo de proximidad de receptor truncado como se describe en el presente documento) en muestras en las que se determinó mediante ICH que eran IHC 3+ para la expresión de HER2.

50 **La figura 21** muestra la discordancia observada entre IHC y COPIA respecto de la expresión de HER2. CU = Unidades Computarizadas normalizadas contra un patrón.

La figura 21 muestra muestras de tejido tumoral de GCA adicional que ilustran la discordancia observada entre IHC y COPIA respecto de la expresión de HER2.

55 **La figura 23** muestra los niveles de expresión de p95HER2 observados mediante COPIA en muestras tumorales de GCA que también se puntuaron mediante IHC para la expresión de HER2.

Descripción detallada de la invención

60 I. Introducción

65 Como se ha descrito anteriormente, la activación de vías de transducción de señales que están implicadas en la proliferación celular y la desactivación de vías que están implicadas en la muerte celular son ejemplos no limitantes de características moleculares que caracterizan muchos tipos de cáncer diferentes. En muchos casos, la actividad de vías de transducción de señales particulares y de los componentes de las mismas, pueden servir como firmas moleculares para un tipo de cáncer particular. Dichos componentes activados pueden proporcionar además dianas

útiles para intervención terapéutica. Por consiguiente, el conocimiento del nivel de actividad de un sistema de transducción de señales particular con una célula cancerosa antes de, durante y después del tratamiento proporciona al médico información altamente relevante que puede usarse para seleccionar la adopción de un ciclo de tratamiento adecuado. Además, el control continuado de las vías de transducción de señales que se encuentran activas en las células cancerosas a medida que avanza el tratamiento puede proporcionar al médico información adicional acerca de la eficacia del tratamiento, que impulsen al médico a continuar con un ciclo de tratamiento concreto o a cambiar a otra línea de tratamiento, cuando, por ejemplo, las células cancerosas se han vuelto resistentes al tratamiento mediante aberraciones adicionales que activan la misma u otra vía de transducción de señales.

Por consiguiente, la presente invención proporciona métodos y composiciones para detectar la expresión y los estados de activación de una serie de moléculas de transducción de señales desreguladas en tejido tumoral o células extratumorales, tales como células circulantes escasas de un tumor sólido en un ensayo específico, multiplexado, de alto rendimiento. La presente invención también proporciona métodos y composiciones para la selección de una terapia adecuada (fármacos individuales o combinaciones de fármacos) para regular negativamente o apagar una vía de señalización desregulada. Por lo tanto, la invención puede usarse para facilitar el diseño de terapias personalizadas para pacientes con cáncer.

La capacidad de detectar e identificar células tumorales en la circulación mediante la determinación de la actividad de vías de transducción de señales a nivel de células individuales es una ventaja importante de la presente invención. A menudo, las células tumorales se encuentran en la sangre de pacientes con diversos estados tempranos de cáncer en forma de "micrometástasis" (células tumorales diseminadas) y también se encuentran en cánceres metastásicos. El número de células tumorales en la sangre dependerá del estadio y tipo de tumor. Aunque a menudo se obtienen biopsias de tumores primarios, la mayoría de tumores metastásicos no se biopsian, haciendo que el análisis molecular de dichas muestras tumorales sea muy difícil. Durante la metástasis de tumores, las células tumorales más agresivas abandonan el tumor primario y viajan a través de la sangre y el sistema linfático para alcanzar una ubicación distante. Por lo tanto, las células tumorales circulantes de la sangre representan la población de células tumorales más agresiva y homogénea. Sin embargo, el número de células tumorales en la sangre es frecuentemente muy bajo, variando desde una hasta varios miles de células por mililitro de sangre. La capacidad para aislar y ensayar vías de transducción de señales en dichas células escasas y de aplicar esta información hacia tratamientos para el cáncer más eficaces es un objeto de la presente invención.

En algunas realizaciones, los inmunoensayos multiplexados de alto rendimiento de la presente invención pueden detectar el estado de activación de una o más moléculas de transducción de señales en células circulantes de un tumor sólido a nivel de células individuales. De hecho, las moléculas de transducción de señales, tales como EGFR y HER2, pueden detectarse con una sensibilidad de aproximadamente 100 zeptomoles y un intervalo dinámico lineal de aproximadamente 100 zeptomoles a aproximadamente 100 femtomoles. Como tal, la detección en células individuales del estado de activación de múltiples transductores de señales en células circulantes escasas facilita el pronóstico y el diagnóstico del cáncer, así como el diseño de terapias personalizadas y dirigidas.

Las células en circulación escasas incluyen células en circulación de un tumor sólido que han metastatizado o micrometastatizado a partir de un tumor sólido. Las células tumorales en circulación, las células madre de cáncer y las células que migran a un tumor (por ejemplo, debido a la quimioatracción) tales como células progenitoras endoteliales en circulación, células endoteliales en circulación, células mieloides pro-angiogénicas en circulación y células dendríticas en circulación son algunos ejemplos de células en circulación asociadas con un tumor sólido.

Típicamente, las moléculas de transducción de señales de interés se extraen típicamente poco después de aislarse las células en circulación para conservar su estado de activación *in situ*, preferentemente en aproximadamente 24, 6 o 1 h y más preferentemente en aproximadamente 30, 15 o 5 minutos. También pueden incubarse las células aisladas con uno o más factores de crecimiento, normalmente a concentraciones de nanomolar a micromolar, durante aproximadamente 1-30 minutos para resucitar o estimular la activación de las moléculas de transducción de señales (véase, por ejemplo, Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)).

Como se explica con más detalle en el presente documento, para evaluar potenciales terapias anticáncer para un paciente individual, pueden incubarse las células aisladas con uno o más fármacos anticáncer a diversas dosis. Después, puede llevarse a cabo la estimulación con factores de crecimiento durante unos pocos minutos (por ejemplo, aproximadamente 1-5 minutos) o durante varias horas (por ejemplo, aproximadamente 1-6 horas). La activación diferencial de vías de señalización con y sin fármacos anticáncer puede ayudar en la selección de una terapia para el cáncer adecuado a una dosis adecuada para cada paciente individual. También pueden aislarse células circulantes de una muestra de paciente durante el tratamiento con fármacos anticáncer y estimularse con uno o más factores de crecimiento para determinar si debería implementarse un cambio en la terapia. Como tal, los métodos de la presente invención ayudan ventajosamente al médico a proporcionar el fármaco anticáncer adecuado a la dosis adecuada en el momento adecuado para cada paciente.

A diferencia de las opciones de ensayo para el cáncer gástrico disponibles actualmente, los métodos de la presente invención permiten el control de pacientes de cáncer gástrico a lo largo de todos los estadios de la enfermedad

proporcionando una "biopsia en tiempo real" de tumores gástricos sólidos usando muertas, tales como células tumorales en circulación (CTC) de la sangre y/o aspirados con aguja fina (FNA). Como ejemplo no limitante, el ensayo para el cáncer gástrico descrito en el presente documento puede usarse en el diagnóstico inicial del cáncer gástrico en un paciente en un estadio temprano de la enfermedad. La selección de una terapia para el cáncer adecuada está guiada por la elaboración de un perfil de expresión y/o activación de vías de señalización específicas con y sin fármacos anticáncer usando los ensayos descritos en el presente documento. Ventajosamente, también pueden usarse los métodos de la presente invención para controlar la progresión o regresión de la enfermedad ya que la intervención terapéutica puede estar basada en muestras tomadas en cualquier estadio de la enfermedad y analizarse usando los ensayos descritos en el presente documento. Como tal, la selección de terapias para el cáncer adecuadas para los estadios tempranos y metastásicos del cáncer gástrico está guiada por diagnóstico en tiempo real y un análisis de la expresión y/o el estado de activación de moléculas de vía de señalización específicas.

Los métodos de la presente invención están diseñados beneficiosamente para abordar problemas clave en la gestión del cancer y proporcionar un mayor estándar de cuidado para pacientes de cáncer gástrico debido a que (1) proporcionan una sensibilidad aumentada (por ejemplo, puede lograrse la detección de células individuales para detectar moléculas de transducción de señales totales y fosforiladas, tales como EGFR y HER2), (2) proporcionar una especificidad aumentada (por ejemplo, los ensayos de proximidad de tres anticuerpos mejoran la especificidad para detectar moléculas de transducción de señales totales y fosforiladas), (3) posibilitar la elaboración del perfil de la vía (por ejemplo, la expresión y/o estado de activación de moléculas de transducción de señales específicas puede detectarse en CTC o FNA de pacientes) y (4) eliminar cualquier problema con la obtención de muestras del paciente (por ejemplo, pueden llevarse a cabo los ensayos en unas pocas células tumorales). Aunque puede usarse cualquier muestra en los ensayos descritos en el presente documento, Las CTC son particularmente útiles debido a que representan las células tumorales más agresivas, se sabe que cada tumor desprende CTC, pueden ser la única fuente de tumores residuales o de tumores metastásicos de difícil acceso y se encuentran en la sangre. Como tal, los métodos de la presente invención permiten la toma de muestras en serie de tejidos de tumor gástrico, dando como resultado información valiosa acerca de los cambios que se producen en células tumorales en función del tiempo y la terapia y proporcionando a los médicos una forma de controlar las firmas de vías de cánceres de rápida evolución.

En resumen, las composiciones y métodos de la presente invención proporcionan ventajosamente una predicción, selección y control preciso de pacientes con cáncer (por ejemplo, pacientes con cáncer gástrico) muy probablemente para que se beneficien de la terapia dirigida llevando a cabo elaboración de perfiles de vías en células tumorales fácilmente accesibles usando ensayos de proximidad multiplexados, basados en anticuerpos.

II. Definiciones

Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a los mismos, a menos que se especifique lo contrario.

Se pretende que el término "cáncer" incluya cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento no controlado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas conocidas, ya se caractericen como malignas, benignas, de tejidos blandos o sólidos y cánceres de todos los estadios y grados, incluyendo cánceres pre y post-metastásicos. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cánceres digestivos y gastrointestinales, tales como cáncer gástrico (por ejemplo, cáncer de esófago), cáncer colorrectal, tumores estromales gastrointestinales (GIST), tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de intestino delgado y cáncer de esófago; cáncer de mama; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico); cáncer de vesícula biliar; cáncer de hígado; cáncer de páncreas; cáncer de apéndice; cáncer de próstata, cáncer de ovario; cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales); cáncer del sistema nervioso central; cáncer de piel; linfomas; gliomas; coriocarcinomas; cánceres de cabeza y cuello; sarcomas osteogénicos; y cánceres hematológicos. Tal como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

El término "analito" incluye cualquier molécula de interés, típicamente, una macromolécula, tal como un polipéptido, cuya presencia, cantidad (nivel de expresión), estado de activación y/o identidad se determina. En determinados casos, el analito es una molécula de transducción de señales, tal como, *por ejemplo*, un componente de la vía de señalización de HER2 (ErbB2) o c-Met.

El término "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que llevan a cabo el proceso mediante el cual una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una respuesta, implicando típicamente secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas dentro de la célula. Los ejemplos de moléculas de transducción de señales incluyen, pero sin limitación, tirosina cinasas receptoras, tales como EGFR (por ejemplo, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1/KDR, VEGFR3/FLT4, FLT3/FLK2, PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor relacionado con el receptor de insulina), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, c-MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-cadherina, LTK (tirosina cinasa de leucocitos), ALK (cinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK,

AATYK 1-3 y RTK 106; formas truncadas de tirosina cinasas receptoras, tales como receptores HER2 truncados con dominios extracelulares amino-terminal ausentes (por ejemplo, p95ErbB2 (p95m), p 110, p95c, p95n, *etc.*); dímeros de tirosina cinasas receptoras (por ejemplo, p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, *etc.*); tirosina cinasas no receptoras, tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK; componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, tales como AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, variante de corte y empalme alfa I de p70 S 6 cinasa), proteína tirosina fosfatasa (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, *etc.*), RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc (p66), Ras (por ejemplo, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Racl, Cdc42, PLC, PKC, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, GSK-3 β , RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 y paxilina; receptores de hormonas nucleares, tales como receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de andrógenos, receptor de glucocorticoides, receptor mineralocorticoide, receptor de vitamina A, receptor de vitamina D, receptor de retinoides, receptor de hormonas tiroideas y receptores huérfanos; coactivadores y represores de receptores nucleares, tales como amplificado en cáncer de mama-1 (AIB1) y correpresor de receptor nuclear 1 (NCOR), respectivamente; y combinaciones de los mismos.

La expresión "componente de una vía de señalización de HER2" incluye uno cualquiera o más de un ligando aguas arriba de HER2, compañero de unión de HER2 y/o molécula efectora aguas abajo que se modula mediante HER2. Los ejemplos de componentes de vías de señalización de HER2 incluyen, pero sin limitación, herregulina, HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4, AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, PTEN, SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, variante de corte y empalme alfa I), proteína tirosina fosfatasa (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, *etc.*), dímeros de HER2 (por ejemplo, p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, *etc.*), GSK-3 β , PIP2, PIP3, p27 y combinaciones de los mismos.

La expresión "componente de una vía de señalización de c-Met" incluye uno cualquiera o más de un ligando aguas arriba de c-Met, compañero de unión de c-Met y/o molécula efectora aguas abajo que se modula mediante c-Met. Los ejemplos de componentes de vías de señalización de c-Met incluyen, pero sin limitación, factor de crecimiento de hepatocitos/factor de dispersión (HGF/SF), Plexina B1, CD44v6, AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), STAT (por ejemplo, STAT1, STAT3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), GRB2, Shc (p66), Ras (por ejemplo, K-Ras, N-Ras, H-Ras), GAB1, SHP2, SRC, GRB2, CRKL, PLC γ , PKC (por ejemplo, PKC α , PKC β , PKC δ), paxilina, FAK, aducina, RB, RB1, PYK2 y combinaciones de los mismos.

La expresión "estado de activación" se refiere a si está activada una molécula de transducción de señales particular, tal como un componente de una vía de señalización de HER2 o c-Met. De manera similar, la expresión "nivel de activación" se refiere al grado de activación de una molécula de transducción de señales, tal como un componente de una vía de señalización de HER2 o c-Met. El estado de activación corresponde típicamente al estado de fosforilación, ubiquitinación y/o complejación de una o más moléculas de transducción de señales. Los ejemplos no limitantes de estados de activación (listados entre paréntesis) incluyen: HER1/EGFR (EGFRvIII, (p-) EGFR fosforilado, EGFR:Shc, (u-) EGFR ubiquitinado, p-EGFRvIII); ErbB2 (p-ErbB2, p95HER2 (ErbB2 truncado), p-p95HER2, ErbB2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-MET (p-c-MET, complejo c-Met:HGF); AKT1 (p-AKT1); AKT2 (p-AKT2); AKT3 (p-AKT3); PTEN (p-PTEN); P70S6K (p-P70S6K); MEK (p-MEK); ERK1 (p-ERK1); ERK2 (p-ERK2); PDK1 (p-PDK1); PDK2 (p-PDK2); SGK3 (p-SGK3); 4E-BP1 (p-4E-BP1); PIK3R1 (p-PIK3R1); c-KIT (p-c-KIT); ER (p-ER); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1 R:PI3K); INSR (p-INSR); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRA (p-PDGFRA); PDGFRB (p-PDGFRB); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLC γ , VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLC γ , VEGFR2:Src, VEGFR2:sulfato de heparina, VEGFR2:VE-cadherina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); TIE1 (p-TIE1); TIE2 (p-TIE2); EPHA (p-EPHA); EPHB (p-EPHB); GSK-3 β (p-GSK-3 β); NF κ B (p-NF κ B), I κ B (p-I κ B, p-P65:I κ B); BAD (p-BAD, BAD:14-3-3); mTOR (p-mTOR); Rsk-1 (p-Rsk-1); Jnk (p-Jnk); P38 (p-P38); STAT1 (p-STAT1); STAT3 (p-STAT3); FAK (p-FAK); RB (p-RB); Ki67; p53 (p-p53); CREB (p-CREB); c-Jun (p-c-Jun); c-Src (p-c-Src); paxilina (p-paxilina); GRB2 (p-GRB2), Shc (p-Shc), Ras (p-Ras), GAB1 (p-GAB1), SHP2 (p-SHP2), GRB2 (p-GRB2), CRKL (p-CRKL), PLC γ (p-PLC γ), PKC (por ejemplo, p-PKC α , p-PKC β , p-PKC δ), aducina (p-aducina), RB1 (p-RB1) y PYK2 (p-PYK2).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "dilución en serie" pretende incluir una serie de concentraciones descendentes de una muestra particular (por ejemplo, lisado celular) o reactivo (por ejemplo, anticuerpo). Normalmente, una dilución en serie se produce mediante un proceso de mezclar una cantidad medida de una concentración de partida de una muestra o reactivo con un diluyente (por ejemplo, tampón de dilución) para crear una concentración menor de la muestra o reactivo y repetir el proceso suficientes veces para obtener el número deseado de diluciones seriadas. La muestra o reactivo puede diluirse en serie al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 o 1000 veces para producir una dilución en serie que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 concentraciones

descendientes de la muestra o reactivo. Por ejemplo, puede producirse una dilución en serie que comprende una dilución seriada de factor 2 de un reactivo de anticuerpo de captura a una concentración inicial de 1 mg/ml mezclando una cantidad de la concentración de partida de anticuerpo de captura con una cantidad igual de un tampón de dilución para crear una concentración de 0,5 mg/ml del anticuerpo de captura y repetir el proceso para obtener concentraciones de anticuerpo de captura de 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml, etc.

La expresión "intervalo dinámico superior", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un ensayo para detectar un analito específico en tan pocas como una célula o en tantas como mil células. Por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento poseen un intervalo dinámico superior debido a que detectan ventajosamente una molécula de transducción de señales particular de interés en aproximadamente 1-10.000 células (por ejemplo, aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 o 10.000 células) usando una dilución en serie de concentraciones de anticuerpo de captura.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "células en circulación" comprende células extratumorales que hayan metastatizado o micrometastatizado desde un tumor sólido. Los ejemplos de células en circulación incluyen, pero sin limitación, células tumorales en circulación, células madre de cáncer y/o células que migran al tumor (por ejemplo, células progenitoras endoteliales en circulación, células endoteliales en circulación, células mieloides pro-angiogénicas en circulación, células dendríticas en circulación, etc.). Pueden obtenerse muestras de paciente que contienen células en circulación de cualquier fluido biológico accesible (por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, esputo, fluido de lavado bronquial, orina, aspirado del pezón, linfa, saliva, aspirado con aguja fina, etc.). En determinados casos, se separa la muestra de sangre completa en una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, sedimento celular). La fracción celular contiene típicamente glóbulos rojos de la sangre, glóbulos blancos de la sangre y/o células en circulación de un tumor sólido, tales como células tumorales en circulación (CTC), células endoteliales en circulación (CEC), células progenitoras endoteliales en circulación (CEPC), células madre de cáncer (CSC), células tumorales diseminadas del ganglio linfático y combinaciones de las mismas. La fracción de plasma o suero contiene normalmente, *entre otras cosas*, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN) y proteínas que se liberan por células circulantes de un tumor sólido.

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

El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un paciente. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos sanguíneos, glóbulos blancos de la sangre (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), fluido de lavado ductal, aspirado del pezón, linfa (por ejemplo, células tumorales diseminadas del ganglio linfático), aspirado de médula ósea, saliva, orina, deposiciones (es decir, heces), esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado con aguja fina (por ejemplo, recogido mediante aspiración periareolar aleatorio con aguja fina), cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (por ejemplo, tejido tumoral), tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo, aguja de biopsia) o un ganglio linfático (por ejemplo, biopsia del ganglio linfático centinela), una muestra de tejido (por ejemplo, tejido tumoral) tal como una resección quirúrgica de un tumor y extractos celulares de los mismos. En algunas realizaciones, la muestra es sangre completa o un componente fraccional de la misma, tal como plasma, suero o un sedimento celular. En realizaciones preferidas, la muestra se obtiene aislando células en circulación de un tumor sólido de sangre completa o una fracción celular de la misma usando cualquier técnica conocida en la materia. En otras realizaciones, la muestra es una muestra de tejido tumoral fijada incluida en parafina (FFPE), *por ejemplo*, de un tumor sólido del estómago u otra porción del tracto gastrointestinal.

Una "biopsia" se refiere al proceso para retirar una muestra de tejido para su evaluación diagnóstica o pronóstica y al espécimen de tejido en sí. Puede aplicarse cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica a los métodos y composiciones de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá generalmente del tipo de tejido que se vaya a evaluar y del tamaño y el tipo del tumor (es decir, sólida o suspendida (es decir, sangre o ascitis)), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen biopsia de escisión, biopsia de incisión, biopsia con aguja (por ejemplo, biopsia de núcleo, biopsia de aspiración con aguja fina, etc.), biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Las técnicas de biopsia se describen, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16ª ed., 2005, Capítulo 70 y a lo largo de la parte V. Un experto en la materia apreciará que pueden llevarse a cabo técnicas de biopsia para identificar células cancerosas y/o precancerosas en una muestra de tejido dada.

El término "sujeto" o "paciente" o "individuo" incluye típicamente seres humanos, pero también puede incluir otros animales, tales como, *por ejemplo*, otros primates, roedores, cánidos, félidos, équidos, óvidos, porcinos y similares.

Una "matriz" o "micromatriz" comprende un conjunto distinto y/o diluciones seriadas de anticuerpos de captura inmovilizados o sujetos sobre un soporte sólido, tal como, por ejemplo, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, pinchos, filtros, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas de poliestireno, *etc.*), papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), *etc.*), ovillos de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. Generalmente, los anticuerpos de captura están inmovilizados o retenidos sobre el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En determinados casos, los anticuerpos de captura comprenden marcadores de captura que interactúan con agentes de captura unidos al soporte sólido. Las matrices usadas en los ensayos descritos en el presente documento comprenden típicamente una serie de diferentes anticuerpos de captura y/o concentraciones de anticuerpo de captura que están acoplados a la superficie de un soporte sólido en ubicaciones conocidas/abordables.

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

La expresión "anticuerpo de detección", tal como se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo que comprende un marcador detectable que es específico para (es decir, se une, está unido a o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra. El término también abarca un anticuerpo que es específico para uno o más analitos de interés, en el que el anticuerpo puede unirse a otra especie que comprende un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero sin limitación, marcadores de biotina/estreptavidina, marcadores de ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos), marcadores químicamente reactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos y combinaciones de los mismos. Hay disponibles anticuerpos de detección adecuados para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquiera de una serie de moléculas de transducción de señales de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA). Como ejemplo no limitante, anticuerpos fosfo-específicos contra diversas formas fosforiladas de moléculas de transducción de señales, tales como EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, AKT, MAPK, PTEN, Raf y MEK están disponibles de Santa Cruz Biotechnology.

La expresión "anticuerpo dependiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico para (es decir, se une, está unido a o forma un complejo con) un estado de activación particular de uno o más analitos de interés en una muestra. En realizaciones preferidas, el anticuerpo dependiente del estado de activación detecta la fosforilación, ubiquitinación y/o estado de complejación de uno o más analitos, tales como una o más moléculas de transducción de señales. En algunas realizaciones, se detecta la fosforilación de miembros de la familia EGFR o de tirosina cinasas receptoras y/o la formación de complejos heterodiméricos entre miembros de la familia EGFR usando anticuerpos dependientes del estado de activación. En realizaciones particulares, los anticuerpos dependientes del estado de activación son útiles para detectar uno o más sitios de fosforilación en una o más de las siguientes moléculas de transducción de señales (los sitios de fosforilación corresponden a la posición del aminoácido en la secuencia de proteína humana): EGFR/HER1/ErbB1 (por ejemplo, tirosina (Y) 1068); ErbB2/HER2 (por ejemplo, Y1248); ErbB3/HER3 (por ejemplo, Y1289); ErbB4/HER4 (por ejemplo, Y1284); c-Met (por ejemplo, Y1003, Y1230, Y1234, Y1235 y/o Y1349); SGK3 (por ejemplo, treonina (T) 256 y/o serina (S) 422); 4E-BP1 (por ejemplo, T70); ERK1 (por ejemplo, T185, Y187, T202 y/o Y204); ERK2 (por ejemplo, T185, Y187, T202 y/o Y204); MEK (por ejemplo, S217 y/o S221); PIK3R1 (por ejemplo, Y688); PDK1 (por ejemplo, S241); P70S6K (por ejemplo, T229, T389 y/o S421); PTEN (por ejemplo, S380); AKT1 (por ejemplo, S473 y/o T308); AKT2 (por ejemplo, S474 y/o T309); AKT3 (por ejemplo, S472 y/o T305); GSK-3 β (por ejemplo, S9); NFKB (por ejemplo, S536); IKB (por ejemplo, S32); BAD (por ejemplo, S112 y/o S136); mTOR (por ejemplo, S2448); Rsk-1 (por ejemplo, T357 y/o S363); Jnk (por ejemplo, T183 y/o Y185); P38 (por ejemplo, T180 y/o Y182); STAT3 (por ejemplo, Y705 y/o S727); FAK (por ejemplo, Y397, Y576, S722, Y861 y/o S910); RB (por ejemplo, S249, T252, S612 y/o S780); RB1 (por ejemplo, S780); aducina (por ejemplo, S662 y/o S724); PYK2 (por ejemplo, Y402 y/o Y881); PKC α (por ejemplo, S657); PKC α/β (por ejemplo, T368 y/o T641); PKC δ (por ejemplo, T505); p53 (por ejemplo, S392 y/o S20); CREB (por ejemplo, S133); c-Jun (por ejemplo, S63); c-Src (por ejemplo, Y416); y paxilina (por ejemplo, Y31 y/o Y118).

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

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos, ya se encuentren en forma monocatenaria o bicatenaria, tal como, por ejemplo, ADN y ARN. Los ácidos

nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos de estructura o engarces modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural y que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2'-O-metilo y ácidos peptidonucleicos (APN). A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Salvo que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservativamente de los mismos y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente.

El término "oligonucleótido" incluye un oligómero o polímero monocatenario de ARN, ADN, híbrido de ARN/ADN y/o un mimético de los mismos. En determinados casos, los oligonucleótidos están compuestos de nucleobases de origen natural (es decir, no modificadas), azúcares y enlaces internucleósido (cadena principal). En otros casos determinados, los oligonucleótidos comprenden nucleobases modificadas, azúcares y/o enlaces internucleósido.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "motivo de desemparejamiento" o "región desemparejada" de un oligonucleótido que no tiene una complementariedad del 100% respecto de su secuencia complementaria. Un oligonucleótido puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones desemparejadas. Las regiones desemparejadas pueden ser contiguas o pueden estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más nucleótidos. Los motivos o regiones desemparejadas pueden comprender un solo nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o más nucleótidos.

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las cuales hibridará un oligonucleótido a su secuencia complementaria, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en circunstancias distintas. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Puede hallarse una guía exhaustiva acerca de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C menores que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias con la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , en 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). También pueden lograrse condiciones rigurosas mediante la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos el doble de la de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo.

Las expresiones "sustancialmente idéntico" o "identidad sustancial", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos que son iguales (es decir, al menos aproximadamente un 60%, preferentemente al menos aproximadamente un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad en una región específica) cuando se compara y alinea para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada medidas usando un algoritmo de comparación de secuencia o mediante alineamiento manual e inspección visual. Esta definición, cuando el contexto así lo indique, también se refiere, de manera análoga, al complemento de una secuencia. Preferentemente, la identidad sustancial existe a lo largo de una región que tiene al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos de longitud.

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

"Tirosina cinasas receptoras" o "RTK" incluye una familia de cincuenta y seis (56) proteínas, caracterizadas por un dominio transmembrana y un motivo de tirosina cinasa. Las RKT funcionan en señalización celular y transmiten señales que regulan el crecimiento, diferenciación, adhesión, migración y apoptosis. La activación y/o sobreexpresión mutacional de tirosina cinasas receptoras transforma las células y a menudo desempeña un papel crucial en el desarrollo de cánceres. Las RTK se han convertido en dianas de varios agentes dirigidos molecularmente, tales como trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib y similares. Una vía de transducción de señales bien caracterizada es la vía de MAP cinasa, que es responsable de transducir la señal del factor de crecimiento epidérmico (EGF) para la promoción de la proliferación celular en células (véase la figura 1).

III. Descripción de las realizaciones

La presente invención proporciona composiciones y métodos para detectar el estado (por ejemplo, niveles de expresión y/o activación) de componentes de vías de transducción de señales en células tumorales procedentes de tejido tumoral o células circulantes de un tumor sólido con un ensayo, tal como un ensayo específico, multiplexado, de proximidad de alto rendimiento como se describe en el presente documento. La presente invención también proporciona composiciones y métodos para seleccionar terapias adecuadas para regular negativamente o desactivar

una o más vías de transducción de señales desreguladas. Por lo tanto, determinadas realizaciones de la invención pueden usarse para facilitar el diseño de terapias personalizadas basándose en la firma molecular concreta proporcionada por la colección de proteínas de transducción de señales totales y activadas en un tumor dado de un paciente (por ejemplo, un tumor gástrico).

En aspectos particulares, la presente invención proporciona marcadores moleculares (biomarcadores) que permiten la determinación o la predicción de si un cáncer particular puede responder o tiene probabilidades de responder favorablemente a un fármaco anticáncer, tal como, por ejemplo, un compuesto modulador de HER2 (por ejemplo, un inhibidor de HER2) y/o un compuesto modulador de c-Met (por ejemplo, un inhibidor de c-Met). En realizaciones específicas, la medición del nivel de expresión y/o activación de uno o más componentes de las vías de señalización de hHER2 y/o c-Met (por ejemplo, HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR y/o PDGFR) es particularmente útil para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado y/o identificar o predecir una respuesta para el mismo en células, tales como células de cáncer gástrico (por ejemplo, células tumorales en circulación aisladas, células de aspirado con aguja fina (FNA) y similares).

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

(a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados entre el grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en un extracto celular producido a partir de una célula de cáncer aislada; y

(b) seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento del cáncer gástrico basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (a).

En algunas realizaciones, se expresa el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos como un valor de unidades relativas de fluorescencia (URF) que se corresponde a la intensidad de señal para un analito de interés particular que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo, tal como el inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA) descrito en el presente documento. En otras realizaciones, el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" que se corresponde con una intensidad de señal creciente para un analito de interés particular que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA. En algunos casos, un nivel no detectable o mínimamente detectable de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "-" o "±". En otros casos, un bajo nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "+". En otros casos más, un nivel moderado de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "++". En otros casos adicionales más, un alto nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "+++". En casos adicionales, un muy alto nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "++++".

En otras realizaciones más, el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos se cuantifica calibrando o normalizando el valor de UFR que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, contra una curva patrón generada para el analito de interés particular. En determinados casos, puede calcularse un valor de unidades computarizadas (UC) basándose en la curva patrón. En otros casos, el valor de UC puede expresarse como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" de acuerdo con la descripción anterior para intensidad de señal. El ejemplo 13 proporciona un ejemplo no limitante de análisis de datos para la cuantificación de proteínas de vías de transducción de señales (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) en células de cáncer gástrico.

En determinadas realizaciones, el nivel de expresión o activación de un analito de interés particular, cuando se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++", puede corresponder a un nivel de expresión o activación que es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces mayor o menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces mayor o menor) que un nivel de expresión o un nivel de activación de referencia, por ejemplo, cuando se compara con un control negativo, tal como un control de IgG, cuando se compara con una curva patrón generada para el analito de interés, cuando se compara con un control positivo, tal como un control pan-CK, cuando se compara con un nivel de expresión o activación determinado en presencia de un fármaco anticáncer y/o cuando se compara con un nivel de expresión o activación en ausencia de un fármaco anticáncer. En algunos casos, la correlación es específica del analito. Como ejemplo no limitante, un nivel de expresión o activación "+" determinado usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede corresponder a un aumento de factor 2 en la expresión o activación para un analito y un aumento de factor 5 para otro analito cuando se compara con un nivel de expresión o activación de referencia.

En algunas realizaciones, se aísla la célula cancerosa de un sujeto que tiene el cáncer gástrico después de la administración de un fármaco anticáncer al sujeto. En otras realizaciones, se pone en contacto la célula cancerosa

aislada con un fármaco anticáncer. En cualquiera de estas realizaciones, el fármaco anticáncer adecuado puede seleccionarse comparando el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos generados en ausencia del fármaco anticáncer.

5 En determinadas realizaciones, la etapa (b) comprende aplicar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (a) para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento del cáncer gástrico.

10 En una realización particular, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer gástrico, comprendiendo el método:

(a) aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;

(b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;

15 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en el extracto celular; y

20 (d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer gástrico.

En otra realización particular, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer gástrico, comprendiendo el método:

25 (a) poner en contacto una célula cancerosa obtenida de una muestra del cáncer gástrico con un fármaco anticáncer;

(b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;

30 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en el extracto celular;

(d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer; y

35 (e) indicar que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer gástrico (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al fármaco anticáncer) cuando el nivel de expresión y/o el nivel de activación determinado en la etapa (c) para los uno o más analitos está cambiado (por ejemplo, reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

40 En determinados casos, el cáncer gástrico es un adenocarcinoma. En otros casos determinados, el cáncer gástrico ha metastatizado al esófago, el intestino delgado, los nódulos linfáticos, órganos, hueso o combinaciones de los mismos.

45 En algunas realizaciones, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos se considera "cambiado" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% más o menos activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En otras realizaciones, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos se considera "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% menos activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En realizaciones adicionales, se considera que el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos está "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer (1) cuando se produce un cambio de expresión y/o activación alta o fuerte del analito sin el fármaco anticáncer a expresión y/o activación media, débil, baja o muy débil del analito con el fármaco anticáncer o (2) cuando se produce un cambio de expresión y/o activación media del analito sin el fármaco anticáncer a expresión y/o activación débil, baja o muy baja del analito con el fármaco anticáncer.

60 Para preservar los estados de activación *in situ*, las proteínas de transducción de señales se extraen típicamente poco después de que se aíslan las células, preferentemente a las 96, 72, 48, 24, 6 o 1 h, más preferentemente a los 30, 15 o 5 minutos. Las células aisladas también pueden incubarse con factores de crecimiento normalmente a concentraciones de nanomolar a micromolar durante aproximadamente 1-30 minutos para resucitar o estimular la activación del transductor de señales (véase, por ejemplo, Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)). Los factores estimulantes incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), herregulina (HGR), TGF- α , PIGF, angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, citocinas y similares. Para evaluar potenciales terapias anticáncer para un paciente individual, pueden incubarse las células aisladas con uno o más fármacos anticáncer a diversas dosis antes de, durante y/o después de la estimulación con factor de crecimiento. La estimulación con

factores de crecimiento puede llevarse a cabo durante unos pocos minutos u horas (por ejemplo, aproximadamente 1-5 minutos a aproximadamente 1-6 horas). Tras el aislamiento, el tratamiento con el fármaco anticáncer y/o la estimulación con factor de crecimiento, se lisan las células para extraer las proteínas de transducción de señales usando cualquier técnica conocida en la materia. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente a los 1-5 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento; y (2) entre aproximadamente 30-180 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento. Como alternativa, el lisado puede almacenarse a -80°C hasta su uso.

- 5
- 10 En algunas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente que interfiere con la función de componentes de vías de transducción de señales activados en células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen aquellos listados a continuación en la tabla 1.

Tabla 1

EGFR (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	HER-4 (ErbB4) diana
Cetuximab Panitumumab Matuzumab Nimotuzumab Vacuna de ErbB1	Trastuzumab (Herceptin®) Pertuzumab (2C4) BMS-599626*	Anticuerpo (U3)	
	*Heterodimerización HER-1/2; Fase 1		
EGFR (ErbB1) (B)	HER-2 (ErbB2) (D)	ErbB1/2 (F)	ErbB1/2/4 (G)
Erlotinib Gefitinib EKB 569* CL-387-785**	CP-724714 (Pfizer)	Lapatinib (Tykerb®) HKI-272* HKI-357 (Preclínico) BIBW 2992**	Canertinib* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth, Irreversible, II CRC) *(Wyeth, Irreversible, Preclínico)		*Wyeth, Irreversible, I/II NSCLC, Mama ** Boehringer Ingelheim, Irreversible, I/II Próstata, Ovárico, Mama	*Pfizer, Irreversible, II NSCLC, Mama
Raf (H)	SRC (H)	Mek: (I)	NFκB-IκB (I)
Sorafenib PLX4032 (Plexxikon)	AZ	PD-325901 (II: NSCLC) AZD6244 - Array/Az XL518 Exelisis/ADN	
mTor (J)	PI3K (J)	VEGFR2 y VEGFR1 (K)	VEGFR1/2/3:
Rad 001: Everolimus* Temsilolimus**	PX-866*	Avastin (ADN) HuMV833*	AZD 2171 (NSCLC, CRC) AMG-706 (+ PDGFR)

mTor (J)	PI3K (J)	VEGFR2 y VEGFR1 (K)	VEGFR1/2/3:
AP-23573***		VEGF-Trap**	
*Everolimus (Novartis, combinación con Gefetinib/Erlotinib; I/II: NSCLC, Glioblastoma) **Temsolimus (Wyeth, combinación con Gefetinib/Erlotinib; I/II: NSCLC, Glioblastoma) ***AP-23573 (Ariad, I/II: Endometrial)	*inhibición específica de P110alfa; ProIX Pharma; NSCLC preclínico	* (PDL) anti-VEGFa **Regeneron/Aventis (Mimético de receptor) (Fase 2)	
Diana de VEGFR2 (L)			
			EPH A-D
DC101* IMC-IC11** IMC1121B Totalmente humanizado CDP-791*** Pazopanib****	CDP-791 (UCB) CP-547632* AG13736** E-7080 (Eisai) CHIR-258*** OSI-930 (+ cKit, PDGFR)	Bay-579352 (+ PDGFR) ABT-869* BMS-540215 (+FGFR1) KRN-951 BBIW	
*Imclone (Fase 2/3?) **IgG1 quimérica contra VEGFR2 ***Celltech, anticuerpo diFab pegilado contra R2 **** GSK, Mieloma múltiple, ovárico, RCC, completado reclutamiento de fase 3, sarcoma II)	*OSI, PFIZER: (+ ErbB1 + PDGFR) (NSCLC, Ovárico, fase 2) **Pfizer: VEGFR1,2 y PDGFRbeta) (RCC II) *** (VEGFR1,2 FGFR3, PDGFR)	 *(+CSF1R, Erk, Flt-3, PDGFR)	
VEGFR 2/ErbB1/2 (ErbBI)/cMet/FGFR (M)	VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/F It-3 (N)	TIE 1/2	VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit (O)
ZD6474* XL647** AEE 788***	Sorafenib*		PTK787 (No cFMS, FLT-3) Sunitinib XL-999 SU-6668 (Pfizer) GSK AZ(AZD2171) BMS Novartis (AEE-788) Amgen

VEGFR 2/ErbB1/2 (ErbBI)/cMet/FGFR (M)	VEGFR2/3/Raf/PDGFR/cKit/F It-3 (N)	TIE 1/2	VEGFR2/1/3, Flt-3, cFMS, PDGFR/cKit (O)
			Otros
*(vandetanib) (Fase III: tiroides, NSCLC) **(Exelixis; También EPHB2): (Pacientes resistentes a Erlotinib; pacientes asiáticos) (Fase 2) *** (Novartis, Fase 1/2)	*(RCC, HCC, NSCLC(III), Melanoma(III))		
Diana de PDGFR (P)	Diana de Abl: (Q)	FTL 3	RET
Tandutinib Nilotinib	Imatinib Dasatinib Nilotinib AT-9283 AZD-0530 Bosutinib		
Diana de Kit (R)	HGFR1/2	FGFR1-4	Diana de IGF-1R (S)
AMG-706 XL-880 XL-999		Chiron	Merck Pfizer Novartis
Inhibidores de HSP90:	Fármacos antimetabólicos:	Otras dianas:	
IPI-504* 17-AAG**	Docetaxel* Paclitaxel** Vinblastina, vincristina, Vinorelbina***	Inhibidores de HDAC BCL2 Quimioterapéuticos (degradación) Inhibidores del proteasoma	
*(Infinity Pharma, ErbB1 mutante, I/II mieloma múltiple, GIST) **(Kosan, I/II tumores sólidos)	*(Estabilizador de microtúbulos; Adyuvante y cáncer de mama avanzado; NSCLC, Cáncer de próstata independiente de andrógenos) ** (Estabilizante de microtúbulos; Adyuvante y cáncer de mama avanzado; NSCLC, Cáncer de ovarios, sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA) *** (desestabilizantes de microtúbulos)		

En determinadas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasa; un agente anti-proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o suprimir el crecimiento no controlado de células aberrantes, tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, las células aisladas se tratan con uno o más agentes anti-señalización, agentes anti-proliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.

- 5
- 10 Los ejemplos de agentes anti-señalización adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales, tales como trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab (2C4), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), gemtuzumab (Mylotarg®), panitumumab (Vectibix™), rituximab

(Rituxan®) y tositumomab (BEXXAR®); inhibidores de tirosina cinasa, tales como gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW-572016; Tykerb®), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar®), mesilato de imatinib (Gleevec®), leflunomida (SU101), vandetanib (ZACTIMA™; ZD6474), pelitinib, CP-654577, CP-724714, HKI-272, PKI-166, AEE788, BMS-599626, HKI-357, BIBW 2992, ARRY-334543, JNJ-26483327 y JNJ-26483327; y combinaciones de los mismos.

Los agentes antiproliferativos ejemplares incluyen inhibidores de mTOR, tales como sirolimus (rapamicina), temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), BEZ235 y XL765; inhibidores de AKT, tales como 1L6-hidroxi-metil-qui-ro-inositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-*sn*-glicerocarbonato, acetato de 9-metoxi-2-metiletilpticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complejo Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido 15-mero obtenido a par tir de los aminoácidos 10-24 del proto-oncogén TCL1 (Hiromura et al., J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1 y los compuestos descritos en Kozikowski et al., J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145 (2003) y Kau et al., Cancer Cell, 4:463-476 (2003); inhibidores de PI3K, tales como PX-866, wortmanina, LY 294002, quercetina, citrato de tetrodotoxina, maleato de tioperamida, GDC-0941 (957054-30-7), IC87114, PI-103, PIK93, BEZ235 (NVP-BEZ235), TGX-115, ZSTK474, (-)-deguelina, NU 7026, miricetina, tandutinib, bismesilato de GDC-0941, GSK690693, KU-55933, MK-2206, OSU-03012, perifosina, triciribina, XL-147, PIK75, TGX-221, NU 7441, PI 828, XL-765 y WHI-P 154; inhibidores de MEK, tales como PD98059, ARRY-162, RDEA119, U0126, GDC-0973, PD184161, AZD6244, AZD8330, PD0325901 y ARRY-142886; y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de inhibidores pan-HER incluyen PF-00299804, neratinib (HKI-272), AC480 (BMS-599626), BMS-690154, PF-02341066, HM781-36B, CI-1033, BIBW-2992 y combinaciones de los mismos.

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

Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales incluyen, sin limitación, inhibidores de aromatasa (por ejemplo, aminoglutetimida, anastrozol (Arimidex®), letrozol (Femara®), vorozol, exemestano (Aromasin®), 4-androsteno-3,6,17-triona (6-OXO), 1,4,6-androstatrien-3,17-diona (ATD), formestano (Lentaron®), etc.), moduladores selectivos de receptores de estrógenos (por ejemplo, bazedoxifeno, clomifeno, fulvestrant, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, etc.), esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasterida y agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), tales como goserelina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de vacunas para el cáncer útiles en la presente invención incluyen ANYARA de Active Biotech, DCVax-LB de Northwest Biotherapeutics, EP-2101 de IDM Pharma, GV1001 de Pharmexa, IO-2055 de Idera Pharmaceuticals, INGN 225 de Introgen Therapeutics y Stimuvax de Biomira/Merck.

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

Los ejemplos no limitantes de compuestos que modulan la actividad de HER2 se describen en el presente documento e incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina cinasa y combinaciones de los mismos. En realizaciones preferidas, el compuesto modulador de HER2 inhibe la actividad de HER2 y/o bloquea la señalización de HER2, por ejemplo, es un inhibidor de HER2. Los ejemplos de inhibidores de HER2 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, tales como trastuzumab (Herceptin®) y pertuzumab (2C4); inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña, tales como gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), pelitinib, CP-654577, CP-724714, canertinib (CI 1033), HKI-272, lapatinib (GW-572016; Tykerb®), PKI-166, AEE788, BMS-599626, HKI-357, BIBW 2992, ARRY-334543, JNJ-26483327 y JNJ-26483327; y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el compuesto modulador de HER2 activa la vía de HER2, por ejemplo, es un activador de HER2.

Los ejemplos no limitantes de compuestos que modulan la actividad de c-Met se describen en el presente documento e incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores de molécula pequeña y combinaciones de los mismos. En realizaciones preferidas, el compuesto modulador de c-Met inhibe la actividad de c-Met y/o bloquea la señalización de c-Met, por ejemplo, es un inhibidor de c-Met. Los ejemplos de inhibidores de c-Met incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, tales como AMG102 y MetMab; inhibidores de molécula pequeña de c-Met,

tales como ARQ197, JNJ-38877605, PF-04217903, SGX523, GSK 1363089/XL880, XL184, MGCD265 y MK-2461; y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el compuesto modulador de c-Met activa la vía de c-Met, por ejemplo, es un activador de c-Met.

5 En determinadas realizaciones, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula normal, tal como una célula no cancerosa de un individuo sano que no tiene un cáncer, tal como cáncer gástrico. En otras realizaciones determinadas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado
10 en la etapa (c) se obtiene de una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico procedente de un paciente con un cáncer, tal como cáncer gástrico.

En algunas realizaciones, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula (por ejemplo, una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) que no se trata con el fármaco anticáncer. En realizaciones particulares, la célula que no se trata con el fármaco anticáncer se obtiene de la misma muestra que la célula aislada (por ejemplo, una célula de ensayo que se vaya a interrogar) usada para producir el extracto celular. En determinados casos, la presencia de un nivel de expresión o de activación menor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer gástrico (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al fármaco anticáncer). En otros casos determinados, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o mayor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es inadecuado para el tratamiento del cáncer gástrico (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad reducida de respuesta al fármaco anticáncer).
15
20
25

En realizaciones alternativas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula sensible al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En dichas realizaciones, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o menor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer gástrico (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al fármaco anticáncer). En otras realizaciones alternativas determinadas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula resistente al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En dichas realizaciones, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o mayor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es inadecuado para el tratamiento del cáncer gástrico (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad reducida de respuesta al fármaco anticáncer).
30
35
40

En determinadas realizaciones, un mayor nivel de expresión o de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se considera que está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces mayor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces mayor) que el nivel de expresión o activación del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) no tratada con el fármaco anticáncer, en una célula sensible al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.
45
50

En otras realizaciones, un menor nivel de expresión o de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se considera que está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces menor) que el nivel de expresión o activación del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) no tratada con el fármaco anticáncer, en una célula sensible al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.
55
60

Los ejemplos no limitantes de moléculas y vías de transducción de señales que pueden interrogarse usando la presente invención incluyen aquellas mostradas en la tabla 2.

65

Tabla 2

Vía 1	ErbB1	ErbB1 Fosfo	ErbB1 Shc	ErbB1 ubiquitina	ErbB1-PI3K	PTEN		
Vía 2	ErbB1	ErbB1V11	ErbB1V11I Fosfo	ErbB1V11I Shc	ErbB1V11I ubiquitina	ErbB1V11I PI3K	PTEN	
Vía 3	ErbB2	ErbB2 Fosfo	HER-2 Shc	complejo ErbB2:PI3K	ErbB2 ubiquitina	PTEN		
Vía 4	ErbB2	ErbB2 truncado en P95	ErbB2 Fosfo	ERBB2 truncado en P95 Fosfo	HER-2 Shc	complejo ERBB2:PI3K	ErbB2 ubiquitina	P95ErbB2:PI3K
Vía 5	ErbB3	ErbB3 Fosfo	complejo ErbB3:PI3K	ErbB3PI3K Fosfo	ErbB3:Shc			
Vía 6	ErbB4	ErbB4 Fosfo	ErbB4:Shc					
Vía 7	IGF-1R	IGF-1R Fosfo	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	Fosfo IRS	IGF-1R:PI3K		
Vía 8	INSR	INSR Fosfo						
Vía 9	KIT	KIT Fosfo						
Vía 10	FLT3	FLT3Phospho						
Vía 11	HGFR 1	HGFR 1 Fosfo						
Vía 12	HGFR2	HGFR 2 Fosfo						
Vía 13	RET	RET Fosfo						
Vía 14	PDGFR alfa	PDGFR alfa fosfo						
Vía 15	PDGFR beta	PDGFR beta fosfo						

Vía 16	VEGFR 1	VEGFR 1 Fosfo	Complejo VEGFR 1:PLCy	VEGFR 1: Src			
Vía 17	VEGFR2	VEGFR2 Fosfo	Complejo VEGFR 2:PLCy	VEGFR 2: Src	complejo VEGFR-2/sulfato de heparina	VEGFR-2, complejo VE-cadherina	
Vía 18	VEGFR3	VEGFR3 Fosfo					
Vía 19	FGFR 1	FGFR 1 Fosfo					
Vía 20	FGFR2	FGFR 2 Fosfo					
Vía 21	FGFR 3	FGFR 3 Fosfo					
Vía 22	FGFR 4	FGFR 4 Fosfo					
Vía 23	TIE 1	TIE 1 Fosfo					
Vía 24	TIE 2	TIE 2 Fosfo					
Vía 25	EPHA	EPHA Fosfo					
Vía 26	EPHB	EPHB Fosfo					
Vía 27	Complejo NFKB-IKB	fosfo-IKB (S32) IKB total	NFKB total fosfo NFKB(S536)	P65 IKBa total Fosfo P65 IKBa			
Vía 28	ER	Fosfo ER	ER-AIB1	Otros complejos de ER			
Vía 29	PR	Fosfo Pr		Complejos de PR			

Vía 30	Vía de Hedgehog											
Vía 31	Vía de Wnt											
Vía 32	Vía de Notch											
Vía 33	Mek total Fosfo Mek (S217/S2 21)	Erk total Fosfo Erk (T202/Y204)	Rsk-1 total Fosfo Rsk-1 (T357/S363)	Stat3 total Fosfo Stat-3 (Y705) (S727) Stat 1 total Fosfo Stat1 (Y701)	Fosfo Bad (S112) Bad (total)	mTor total Fosfo mTor (S2448)	cSrc total Fosfo cSrc(Y416)	Ras total Fosfo Ras				
Vía 34	Akt (Total) Fosfo Akt (T473)	Fosfo Akt (T308)	Fosfo Bad(S112) Bad (total)	Fosfo Bad (S136)	complejo Bad:14-3-3	p70S6K total Fosfo p70S6K (T229)(T389)	GSK3beta Total (Fosfo Ser 9)					
Vía 35	Jnk total Fosfo Jnk (T183/Y185)	P38 total Fosfo P38 (T180/Y182)	Rb total Fosfo Rb (S249/T252) Fosfo Rb (S780)	p53 total Fosfo p53 (S392) Fosfo p53 (S20)	fosfo-CREB (S133) CREB total	c-Jun total fosfo-c-Jun; (S63)	Paxilina total fosfo Paxilina (Y118)					
Vía 36	Kí67	Caspasa 3,8,9 u otras escindida	TOP02									
Vía 37	TGFbeta											

Los ejemplos no limitantes de analitos, tales como moléculas de transducción de señales que pueden interrogarse respecto de sus niveles de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) en un extracto celular incluyen tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

En una realización, los métodos de la presente invención comprenden determinar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno de los siguientes analitos en un extracto celular: (1) HER1/EGFR/ErbB1; (2) HER2/ErbB2; (3) p95HER2; (4) HER3/ErbB3; (5) c-Met; (6) IGF1R; (7) cKit; (8) PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1); (9) Shc; (10) Akt; (11) p70S6K; (12) VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2 y/o VEGFR3); y (13) PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o PDGFRB).

En otra realización, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno de los siguientes pares de dos analitos en un extracto celular, en el que "1" = 5,7,8,12; 5,7, 8,13; 5,8, 9,10; 5,8, 9,11; 5,8, 9,12; 5,8, 9,13; 5,9, 10,11; 5,9, 10,12; 5,9, 10,13; 5,10, 11,12; 5,10, 11,13; 5,11, 12,13; 6,7, 8,9; 6,7, 8,10; 6,7, 8,11; 6,7, 8,12; 6,7, 8,13; 6,8, 9,10; 6,8, 9,11; 6,8, 9,12; 6,8, 9,13; 6,9, 10,11; 6,9, 10,12; 6,9, 10,13; 6,10, 11,12; 6,10, 11,13; 6,11, 12,13; 7,8, 9,10; 7,8, 9,11; 7,8, 9,12; 7,8, 9,13; 7,9, 10,11; 7,9, 10,12; 7,9, 10,13; 7,10, 11,12; 7,10, 11,13; 7,11, 12,13; 8,9, 10,11; 8,9, 10,12; 8,9, 10,13; 8,10, 11,12; 8,10, 11,13; 8,11, 12,13; 9,10, 11,12; 9,10, 11,13; 9,11, 12,13; y 10,11,12,13.

En otra realización más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno de los siguientes conjuntos de tres analitos en un extracto celular, en el que "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, 2, y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B): 1,2, 3; 1,2, 4; 1,2, 5; 1,2, 6; 1,2, 7; 1,2, 8; 1,2, 9; 1,2, 10; 1,2, 11; 1,2, 12; 1,2, 13; 1,3, 4; 1,3, 5; 1,3, 6; 1,3, 7; 1,3, 8; 1,3, 9; 1,3, 10; 1,3, 11; 1,3, 12; 1,3, 13; 1,4, 5; 1,4, 6; 1,4, 7; 1,4, 8; 1,4, 9; 1,4, 10; 1,4, 11; 1,4, 12; 1,4, 13; 1,5, 6; 1,5,7;1,5,8; 1,5, 9; 1,5, 10; 1,5, 11; 1,5, 12; 1,5, 13; 1,6, 7; 1,6, 8; 1,6, 9; 1,6, 10; 1,6, 11; 1,6, 12; 1,6, 13; 1,7, 8; 1,7, 9; 1,7, 10; 1,7,11;1,7,12; 1,7, 13; 1,8, 9; 1,8, 10; 1,8, 11; 1,8, 12; 1,8, 13; 1,9, 10; 1,9, 11; 1,9, 12; 1,9, 13; 1,10, 11; 1,10, 12; 1,10, 13; 1,11,12;1,11,13; 1,12, 13, 2,3, 4; 2,3, 5; 2,3, 6; 2,3, 7; 2,3, 8; 2,3, 9; 2,3, 10; 2,3, 11; 2,3, 12; 2,3, 13; 2,4, 5; 2,4, 6; 2,4, 7; 2,4, 8; 2,4,9;2,4,10; 2,4, 11; 2,4, 12; 2,4, 13; 2,5, 6; 2,5, 7; 2,5, 8; 2,5, 9; 2,5, 10; 2,5, 11; 2,5, 12; 2,5, 13; 2,6, 7; 2,6, 8; 2,6, 9; 2,6, 10; 2,6,11;2,6,12; 2,6, 13; 2,7, 8; 2,7, 9; 2,7, 10; 2,7, 11; 2,7, 12; 2,7, 13; 2,8, 9; 2,8, 10; 2,8, 11; 2,8, 12; 2,8, 13; 2,9, 10; 2,9, 11; 2,9,12;2,9,13; 2,10, 11; 2,10, 12; 2,10, 13; 2,11, 12; 2,11, 13; 2,12, 13; 3,4, 5; 3,4, 6; 3,4, 7; 3,4, 8; 3,4, 9; 3,4, 10; 3,4, 11; 3,4, 12; 3,4,13;3,5,6; 3,5, 7; 3,5, 8; 3,5, 9; 3,5, 10; 3,5, 11; 3,5, 12; 3,5, 13; 3,6, 7; 3,6, 8; 3,6, 9; 3,6, 10; 3,6, 11; 3,6, 12; 3,6, 13; 3,7, 8; 3,7,9;3,7,10; 3,7, 11; 3,7, 12; 3,7, 13; 3,8, 9; 3,8, 10; 3,8, 11; 3,8, 12; 3,8, 13; 3,9, 10; 3,9, 11; 3,9, 12; 3,9, 13; 3,10, 11; 3,10,12;3,10,13; 3,11, 12; 3,11, 13; 3,12, 13; 4,5, 6; 4,5, 7; 4,5, 8; 4,5, 9; 4,5, 10; 4,5, 11; 4,5, 12; 4,5, 13; 4,6, 7; 4,6, 8; 4,6, 9; 4,6,10;4,6,11; 4,6, 12; 4,6, 13; 4,7, 8; 4,7, 9; 4,7, 10; 4,7, 11; 4,7, 12; 4,7, 13; 4,8, 9; 4,8, 10; 4,8, 11; 4,8, 12; 4,8, 13; 4,9, 10; 4,9,11;4,9,12; 4,9, 13; 4,10, 11; 4,10, 12; 4,10, 13; 4,11, 12; 4,11, 13; 4,12, 13; 5,6, 7; 5,6, 8; 5,6, 9; 5,6, 10; 5,6, 11; 5,6, 12; 5,6,13;5,7,8; 5,7, 9; 5,7, 10; 5,7, 11; 5,7, 12; 5,7, 13; 5,8, 9; 5,8, 10; 5,8, 11; 5,8, 12; 5,8, 13; 5,9, 10; 5,9, 11; 5,9, 12; 5,9, 13; 5,10,11;5,10,12; 5,10, 13; 5,11, 12; 5,11, 13; 5,12, 13, 6,7, 8; 6,7, 9; 6,7, 10; 6,7, 11; 6,7, 12; 6,7, 13; 6,8, 9; 6,8, 10; 6,8, 11; 6,8,12;6,8,13; 6,9, 10; 6,9, 11; 6,9, 12; 6,9, 13; 6,10, 11; 6,10, 12; 6,10, 13; 6,11, 12; 6,11, 13; 6,12, 13; 7,8, 9; 7,8, 10; 7,8, 11; 7,8,12;7,8,13; 7,9, 10; 7,9, 11; 7,9, 12; 7,9, 13; 7,10, 11; 7,10, 12; 7,10, 13; 7,11, 12; 7,11, 13; 7,12, 13; 8,9, 10; 8,9, 11; 8,9, 12; 8,9,13;8,10,11; 8,10, 12; 8,10, 13; 8,11, 12; 8,11, 13; 8,12, 13; 9,10, 11; 9,10, 12; 9,10, 13; 9,11, 12; 9,11, 13; 9,12, 13; 10,11,12;10,11,13; 10,12, 13; y 11,12,13.

En otra realización más adicional, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno de los siguientes conjuntos de cuatro analitos en un extracto celular, en el que "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, 2, y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B): 1,2, 3,4; 1,2, 3,5; 1,2, 3,6; 1,2, 3,7; 1,2, 3,8; 1,2, 3,9; 1,2, 3,10; 1,2, 3,11; 1,2, 3,12; 1,2, 3,13; 1,3,4,5;1,3,4,6; 1,3, 4,7; 1,3, 4,8; 1,3, 4,9; 1,3, 4,10; 1,3, 4,11; 1,3, 4,12; 1,3, 4,13; 1,4, 5,6; 1,4, 5,7; 1,4, 5,8; 1,4, 5,9; 1,4, 5,10; 1,4,5,11;1,4,5,12; 1,4, 5,13; 1,5, 6,7; 1,5, 6,8; 1,5, 6,9; 1,5, 6,10; 1,5, 6,11; 1,5, 6,12; 1,5, 6,13; 1,6, 7,8; 1,6, 7,9; 1,6, 7,10; 1,6,7,11;1,6,7,12; 1,6, 7,13; 1,7, 8,9; 1,7, 8,10; 1,7, 8,11; 1,7, 8,12; 1,7, 8,13; 1,8, 9,10; 1,8, 9,11; 1,8, 9,12; 1,8, 9,13; 1,9,10,11;1,9,10,12; 1,9, 10,13; 1,10, 11,12; 1,10, 11,13; 1,11, 12,13; 2,3, 4,5; 2,3, 4,6; 2,3, 4,7; 2,3, 4,8; 2,3, 4,9; 2,3, 4,10; 2,3,4,11;2,3,4,12; 2,3, 4,13; 2,4, 5,6; 2,4, 5,7; 2,4, 5,8; 2,4, 5,9; 2,4, 5,10; 2,4, 5,11; 2,4, 5,12; 2,4, 5,13; 2,5, 6,7; 2,5, 6,8; 2,5,6,9;2,5,6,10; 2,5, 6,11; 2,5, 6,12; 2,5, 6,13; 2,6, 7,8; 2,6, 7,9; 2,6, 7,10; 2,6, 7,11; 2,6, 7,12; 2,6, 7,13; 2,7, 8,9; 2,7, 8,10; 2,7,8,11;2,7,8,12; 2,7, 8,13; 2,8, 9,10; 2,8, 9,11; 2,8, 9,12; 2,8, 9,13; 2,9, 10,11; 2,9, 10,12; 2,9, 10,13; 2,10, 11,12; 2,10,11,13;2,11,12,13; 3,4, 5,6; 3,4, 5,7; 3,4, 5,8; 3,4, 5,9; 3,4, 5,10; 3,4, 5,11; 3,4, 5,12; 3,4, 5,13; 3,5, 6,7; 3,5, 6,8; 3,5, 6,9; 3,5,6,10;3,5,6,11; 3,5, 6,12; 3,5, 6,13; 3,6, 7,8; 3,6, 7,9; 3,6, 7,10; 3,6, 7,11; 3,6, 7,12; 3,6, 7,13; 3,7, 8,9; 3,7, 8,10; 3,7, 8,11; 3,7, 8,12; 3,7, 8,13; 3,8, 9,10; 3,8, 9,11; 3,8, 9,12; 3,8, 9,13; 3,9, 10,11; 3,9, 10,12; 3,9, 10,13; 3,10, 11,12; 3,10, 11,13; 3,11, 12,13; 4,5, 6,7; 4,5, 6,8; 4,5, 6,9; 4,5, 6,10; 4,5, 6,11; 4,5, 6,12; 4,5, 6,13; 4,6, 7,8; 4,6, 7,9; 4,6, 7,10; 4,6, 7,11; 4,6, 7,12; 4,6,7,13;4,7,8,9; 4,7, 8,10; 4,7, 8,11; 4,7, 8,12; 4,7, 8,13; 4,8, 9,10; 4,8, 9,11; 4,8, 9,12; 4,8, 9,13; 4,9, 10,11; 4,9, 10,12; 4,9,10,13;4,10,11,12; 4,10, 11,13; 4,11, 12,13; 5,6, 7,8; 5,6, 7,9; 5,6, 7,10; 5,6, 7,11; 5,6, 7,12; 5,6, 7,13; 5,7, 8,9; 5,7, 8,10; 5,7, 8,11; 5,7, 8,12; 5,7, 8,13; 5,8, 9,10; 5,8, 9,11; 5,8, 9,12; 5,8, 9,13; 5,9, 10,11; 5,9, 10,12; 5,9,

10,13; 5,10, 11,12; 5,10,11,13;5,11,12,13; 6,7, 8,9; 6,7, 8,10; 6,7, 8,11; 6,7, 8,12; 6,7, 8,13; 6,8, 9,10; 6,8, 9,11; 6,8, 9,12; 6,8, 9,13; 6,9, 10,11; 6,9,10,12;6,9,10,13; 6,10, 11,12; 6,10, 11,13; 6,11, 12,13; 7,8, 9,10; 7,8, 9,11; 7,8, 9,12; 7,8, 9,13; 7,9, 10,11; 7,9, 10,12; 7,9,10,13;7,10,11,12; 7,10, 11,13; 7,11, 12,13; 8,9, 10,11; 8,9, 10,12, 8,9, 10,13; 8,10, 11,12; 8,10, 11,13; 8,11, 12,13; 9,10,11,12;9,10,11,13; 9,11, 12,13; y 10,11,12,13.

5 En otra realización, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de cinco de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de cinco analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5; 2,3,4,5,6; 3,4,5,6,7; 4,5,6,7,8; 5,6,7,8,9; 6,7,8,9,10; 7,8,9,10,11; 8,9,10,11,12; o 9,10,11,12,13.

15 En otra realización más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de seis de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de seis analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5,6; 2,3,4,5,6,7; 3,4,5,6,7,8; 4,5,6,7,8,9; 5,6,7,8,9,10; 6,7,8,9,10,11; 7,8,9,10,11,12; o 8,9,10,11,12,13.

25 En otra realización más adicional, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de siete de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de siete analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5,6,7; 2,3,4,5,6,7,8; 3,4,5,6,7,8,9; 4,5,6,7,8,9,10; 5,6,7,8,9,10,11; 6,7,8,9,10,11,12; o 7,8,9,10,11,12,13.

30 En otra realización, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de ocho de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de ocho analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5,6,7,8; 2,3,4,5,6,7,8,9; 3,4,5,6,7,8,9,10; 4,5,6,7,8,9,10,11; 5,6,7,8,9,10,11,12; o 6,7,8,9,10,11,12,13.

40 En otra realización más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de nueve de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de nueve analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5,6,7,8,9; 2,3,4,5,6,7,8,9,10; 3,4,5,6,7,8,9,10,11; 4,5,6,7,8,9,10,11,12; o 5,6,7,8,9,10,11,12,13.

45 En otra realización más adicional, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de diez de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de diez analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10; 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11; 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12; o 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13.

50 En otra realización, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de once de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de once analitos puede comprender una de las siguientes: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11; 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12; o 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13.

60 En otra realización más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación posible de doce de los siguientes analitos: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B). Como ejemplos no limitantes, la combinación de doce analitos puede comprender una de las siguientes:

1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12; o 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13.

5 En otra realización más adicional, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los trece analitos siguientes: "1" = HER1, "2" = HER2, "3" = p95HER2, "4" = HER3, "5" = c-Met, "6" = IGF1R, "7" = cKit, "8" = PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), "9" = Shc, "10" = Akt, "11" = p70S6K, "12" = VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y "13" = PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B).

10 En una realización particular, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, p95HER2 y HER3. En otra realización particular, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1) y Shc. En otra realización particular más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), Shc, Akt, p70S6K, VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B).

20 En determinadas realizaciones, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales en el extracto celular. En algunas realizaciones, los uno o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales comprende una o más moléculas de transducción de señales seleccionadas entre el grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

30 En realizaciones particulares, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de los siguientes analitos adicionales en un extracto celular: HER4, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, PDK2, GSK-3 β , Raf, SRC, NFkB-IkB, mTOR, EPH-A, EPH-B, EPH-C, EPH-D, FLT-3, TIE-1, TIE-2, c-FMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON, PIP2, PIP3, p27, proteína tirosina fosfatasas (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), dímeros de receptor, otros componentes de la vía de señalización de HER2, otros componentes de la vía de señalización de c-Met y combinaciones de los mismos.

40 En algunas realizaciones, la célula (por ejemplo, la célula de ensayo a partir de la cual se produce el extracto celular) es una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico. En determinados casos, la célula tumoral es una célula tumoral circulante o una célula de un aspirado con aguja fina (FNA) obtenida de un tumor. En otras realizaciones, la célula (por ejemplo, la célula de ensayo a partir de la cual se produce el extracto celular) se aísla de una muestra que se obtiene, *por ejemplo*, de un paciente de cáncer gástrico. Los ejemplos no limitantes de muestras incluyen muestras de fluidos corporales, tales como, por ejemplo, una muestra de sangre completa, suero, plasma, fluido de lavado ductal, aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva y/o aspirado con aguja fina (FNA). En realizaciones particulares, la muestra comprende una muestra de sangre completa, suero, plasma y/o tejido tumoral, tal como tejido de tumor gástrico.

50 En determinados casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además una etapa de proporcionar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) a un usuario (por ejemplo, un médico, tal como un oncólogo o médico de cabecera) en un formato legible. En algunos casos, el método puede comprender además enviar o comunicar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) a un médico, *por ejemplo*, un oncólogo o médico de cabecera. En otros casos, el método puede comprender además registrar o almacenar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) en una base de datos informática u otra máquina o dispositivo adecuado para almacenar información, *por ejemplo*, en un laboratorio.

55 En algunas realizaciones, la determinación del nivel de expresión de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende detectar la cantidad total de los uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para el analito correspondiente. En realizaciones particulares, los anticuerpos se unen al analito independientemente del estado de activación del analito que se vaya a detectar, *es decir*, los anticuerpos detectan las formas tanto activadas como no activadas del analito.

65 El nivel y/o estado de expresión total puede determinarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas. En determinadas realizaciones, el nivel y/o el estado de expresión de uno o más analitos, tales como moléculas de transducción de señales en una muestra, se detecta con un inmunoensayo, tal como un ensayo de detección individual o un ensayo de detección dual de proximidad (por ejemplo, un inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA, por sus siglas en inglés, COllaborative Proximity ImmunoAssay) como se describe en el presente

documento.

En determinadas realizaciones, la determinación de los niveles de expresión (por ejemplo, totales) de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) en la etapa (c) comprende:

(i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular con uno o una diversidad de diluciones en serie de anticuerpos de captura (por ejemplo, anticuerpos de captura específicos para uno o más componentes de las vías de señalización de HER2 y/o c-MET) para formar una pluralidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido (por ejemplo, para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y anticuerpos de captura);

(ii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una diversidad de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes (por ejemplo, primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) para formar una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y los anticuerpos de detección),

en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

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

(iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

En otras realizaciones determinadas, la determinación de los niveles de expresión (por ejemplo, totales) de los uno o más analitos en la etapa (c) que son receptores truncados (por ejemplo, p95HER2) comprende:

(i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular con una diversidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) de un receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa);

(ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar un extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) (por ejemplo, para transformar el extracto celular en un extracto celular desprovisto de un receptor específico de longitud completa o una familia de receptores de longitud completa);

(iii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) con uno o una pluralidad de anticuerpos de captura específicos para una región de unión a dominio intracelular (ICD) del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar una pluralidad de receptores truncados capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido (por ejemplo, para transformar los receptores truncados presentes en un extracto celular desprovisto de receptor de longitud completa en complejos de receptores truncados y anticuerpos de captura);

(iv) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación para una región de unión a ICD del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de receptores truncados capturados en complejos de receptores truncados capturados detectables que comprenden los receptores truncados capturados y los anticuerpos de detección),

en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

(v) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y

(vi) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

Los primeros anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse directamente con el resto facilitante o marcarse indirectamente con el resto facilitante, *por ejemplo*, mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado a los primeros anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado al resto facilitante. De manera similar, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse directamente con el primer miembro del par de amplificación de señales o

marcarse indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de señales, *por ejemplo*, mediante unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado a los segundos anticuerpos independientes del estado de activación y un segundo miembro del par de unión conjugado al primer miembro del par de amplificación de señales. En determinados casos, el primer miembro del par de unión es biotina y el segundo miembro del par de unión es una avidina, tal como estreptavidina o neutravidina.

En algunas realizaciones, el resto facilitante puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los primeros anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse a una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo, tal como se describe en, *por ejemplo*, los ejemplos 16-17 de la Publicación PCT n.º WO2009/108637. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (por ejemplo, aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o 750 kDa). En otras realizaciones, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En otras realizaciones más, el primer miembro del par de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP). En realizaciones adicionales, el segundo miembro del par de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo de tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación por peroxidasa de biotina-tiramida para producir una tiramida activada (por ejemplo, para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directamente o detectarse indirectamente, *por ejemplo*, tras la adición de un reactivo de detección de señales. Los ejemplos no limitantes de reactivos de detección de señales incluyen fluoróforos marcados con estreptavidina y combinaciones de peroxidasa marcada con estreptavidinas y reactivos comogénicos, tales como, *por ejemplo*, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

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

El receptor truncado es típicamente un fragmento del receptor de longitud completa y comparte una región de unión a dominio intracelular (ICD) con el receptor de longitud completa. En determinadas realizaciones, el receptor de longitud completa comprende una región de unión a dominio extracelular (ECD), un dominio transmembrana y una región de unión a dominio intracelular. Sin quedar ligados a cualquier teoría particular, el receptor truncado puede surgir del procesamiento proteolítico del ECD del receptor de longitud completa o mediante el inicio alternativo de la traducción a partir de restos de metionina que están ubicados antes, en o después del dominio transmembrana, *por ejemplo*, para crear un receptor truncado con un ECD acortado o un receptor truncado que comprende un fragmento de ICD asociado a membrana o citosólico.

En determinadas realizaciones preferidas, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor correspondiente de longitud completa es HER2. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos descritos en el presente documento para detectar proteínas truncadas pueden aplicarse a una serie de proteínas diferentes incluyendo, pero sin limitación, el mutante VIII de EGFR (implicado en el glioblastoma, cáncer colorrectal, *etc.*), otras tirosina cinasas receptoras truncadas, caspasas y similares. El ejemplo 12 de la publicación PCT n.º WO2009/108637 proporciona una realización ejemplar de los métodos de ensayo de la presente invención para detectar receptores truncados, tales como p95HER2 en células usando un ELISA multiplexado, de alto rendimiento, de detección dual de proximidad que tiene un intervalo dinámico superior.

En algunas realizaciones, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a ECD comprende un par de estreptavidina-biotina, en el que la estreptavidina está unida a la perla y la biotina está unida al anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa).

En algunas realizaciones, cada dilución en serie de los anticuerpos de captura comprende una serie de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura. En determinados casos, los anticuerpos de captura se diluyen en serie a al menos factor 2 (por ejemplo, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces) para producir una dilución en serie que comprende un número determinado (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de concentraciones descendentes del anticuerpo de captura que se puntúan sobre una matriz. Preferentemente, se puntúan al menos 2, 3, 4, 5 o 6 replicados de cada dilución de anticuerpo de captura sobre la matriz.

En otras realizaciones, el soporte sólido comprende vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, pinchos, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), *etc.*), ovillos de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En una realización preferente, los anticuerpos de captura están retenidos (por ejemplo, mediante interacciones covalentes o no covalentes) sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, tal como, por ejemplo, portaobjetos FAST®, que están disponibles comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

En realizaciones adicionales, la determinación de los niveles de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende detectar un nivel

de fosforilación de los uno o más analitos en el extracto celular con anticuerpos específicos para la forma fosforilada de cada uno de los analitos que se vayan a detectar.

Los niveles y/o el estado de fosforilación pueden determinarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas. Por ejemplo, se sabe de sobra en la técnica que las proteínas fosforiladas pueden detectarse mediante inmunoensayos que usan anticuerpos que reconocen específicamente la forma fosforilada de la proteína (véase, por ejemplo, Lin et al., Br. J. Cancer, 93:1372-1381 (2005)). Los inmunoensayos incluyen generalmente inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia de Western), RIA y ELISA. Los tipos de inmunoensayo más específicos incluyen competición de captura de antígeno/antígeno, competición de captura de anticuerpo/antígeno, sándwiches de dos anticuerpos, captura de anticuerpo/exceso de anticuerpo y captura de anticuerpo/exceso de antígeno. Los métodos para producir anticuerpos se describen en el presente documento y en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE.UU. Pueden producirse *de novo* anticuerpos fosfo-específicos u obtenerse de fuentes comerciales o no comerciales. También pueden determinarse los niveles y/o el estado de fosforilación marcando metabólicamente las células con fosfato radiactivo en forma de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ o $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$. Las proteínas fosforiladas se vuelven radiactivas y, por lo tanto, trazables y cuantificables mediante conteo de centelleo, radiografía y similares (véase, por ejemplo, Wang et al., J. Biol. Chem., 253:7605-7608 (1978)). Por ejemplo, las proteínas marcadas metabólicamente pueden extraerse de células, separarse por electroforesis en gel, transferirse a una membrana, sondarse con un anticuerpo específico para un componente particular de la vía de señalización de HER2 y someterse a autorradiografía para detectar ^{32}P o ^{33}P . Como alternativa, el gel puede someterse a autorradiografía antes de la transferencia a la membrana y el sondaje con anticuerpos.

En realizaciones particulares, el nivel y/o el estado de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) se detecta con un inmunoensayo, tal como un ensayo de detección individual o un ensayo de detección dual de proximidad (por ejemplo, un inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA, por sus siglas en inglés, Collaborative Proximity ImmunoAssay) como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, la determinación del nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de las vías de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular con una dilución en serie de anticuerpos de captura (por ejemplo, anticuerpos de captura específicos para uno o más componentes de las vías de señalización de HER2 y/o c-Met) para formar una pluralidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido (por ejemplo, para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y anticuerpos de captura);
- (ii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes (por ejemplo, anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) para formar una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y los anticuerpos de detección), en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;
- (iii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

En otras realizaciones determinadas, la determinación del nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos en la etapa (c) que son receptores truncados (por ejemplo, p95HER2) comprende:

- (i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular con una diversidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) de un receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa);
- (ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar un extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) (por ejemplo, para transformar el extracto celular en un extracto celular desprovisto de un receptor específico de longitud completa o una familia de receptores de longitud completa);
- (iii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) con una pluralidad de anticuerpos de captura específicos para una región

de unión a dominio intracelular (ICD) del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar una pluralidad de receptores truncados capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido (por ejemplo, para transformar los receptores truncados presentes en un extracto celular desprovisto de receptor de longitud completa en complejos de receptores truncados y anticuerpos de captura);

(iv) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de os receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para una región de unión a ICD del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de receptores truncados capturados en complejos de receptores truncados capturados detectables que comprenden los receptores truncados capturados y los anticuerpos de detección),

en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

(v) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y

(vi) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

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

En algunas realizaciones, el resto facilitante puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse a una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo, tal como se describe en, *por ejemplo*, Los ejemplos 16-17 de la Publicación PCT n.º WO2009/108637. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 500kDa (por ejemplo, aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o 750 kDa). En otras realizaciones, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En otras realizaciones más, el primer miembro del par de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP). En realizaciones adicionales, el segundo miembro del par de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, un reactivo de tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación por peroxidasa de biotina-tiramida para producir una tiramida activada (por ejemplo, para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directamente o detectarse indirectamente, *por ejemplo*, tras la adición de un reactivo de detección de señales. Los ejemplos no limitantes de reactivos de detección de señales incluyen fluoróforos marcados con estreptavidina y combinaciones de peroxidasa marcadas con estreptavidinas y reactivos comogénicos, tales como, *por ejemplo*, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

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

El receptor truncado es típicamente un fragmento del receptor de longitud completa y comparte una región de unión a dominio intracelular (ICD) con el receptor de longitud completa. En determinadas realizaciones, el receptor de longitud completa comprende una región de unión a dominio extracelular (ECD), un dominio transmembrana y una región de unión a dominio intracelular. Sin quedar ligados a cualquier teoría particular, el receptor truncado puede surgir del procesamiento proteolítico del ECD del receptor de longitud completa o mediante el inicio alternativo de la traducción a partir de restos de metionina que están ubicados antes, en o después del dominio transmembrana, *por ejemplo*, para crear un receptor truncado con un ECD acortado o un receptor truncado que comprende un fragmento de ICD asociado a membrana o citosólico.

En determinadas realizaciones preferidas, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor correspondiente de longitud completa es HER2. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos descritos en el presente documento para detectar proteínas truncadas pueden aplicarse a una serie de proteínas diferentes incluyendo, pero sin limitación, el mutante VIII de EGFR (implicado en el glioblastoma, cáncer colorrectal, etc.), otras tirosina cinasas receptoras truncadas, caspasas y similares. El ejemplo 12 de la publicación PCT n.º WO2009/108637 proporciona una realización ejemplar de los métodos de ensayo de la presente invención para

detectar receptores truncados, tales como p95HER2 en células usando un ELISA multiplexado, de alto rendimiento, de detección dual de proximidad que tiene un intervalo dinámico superior.

5 En algunas realizaciones, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a ECD comprende un par de estreptavidina-biotina, en el que la estreptavidina está unida a la perla y la biotina está unida al anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa).

10 En algunas realizaciones, cada dilución en serie de los anticuerpos de captura comprende una serie de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura. En determinados casos, los anticuerpos de captura se diluyen en serie a al menos factor 2 (por ejemplo, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces) para producir una dilución en serie que comprende un número determinado (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de concentraciones descendentes del anticuerpo de captura que se puntúan sobre una matriz. Preferentemente, se puntúan al menos 2, 3, 4, 5 o 6 replicados de cada dilución de anticuerpo de captura sobre la matriz.

15 En otras realizaciones, el soporte sólido comprende vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, pinchos, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), ovillos de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En una realización preferente, los anticuerpos de captura están retenidos (por ejemplo, mediante interacciones covalentes o no covalentes) sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, tal como, por ejemplo, portaobjetos FAST®, que es tan disponibles comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

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

25 (a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados entre el grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en un extracto celular producido a partir de una célula de cáncer aislada; y
 30 (b) identificar la respuesta del cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más de los analitos determinados en la etapa (a).

En algunas realizaciones, se expresa el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos como un valor de unidades relativas de fluorescencia (URF) que se corresponde a la intensidad de señal para un analito de interés particular que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo, tal como el inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA) descrito en el presente documento. En otras realizaciones, el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" que se corresponde con una intensidad de señal creciente para un analito de interés particular que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA. En algunos casos, un nivel no detectable o mínimamente detectable de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "-" o "±". En otros casos, un bajo nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "+". En otros casos más, un nivel moderado de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "++". En otros casos adicionales más, un alto nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "+++". En casos adicionales, un muy alto nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "++++".

50 En otras realizaciones más, el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos se cuantifica calibrando o normalizando el valor de UFR que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, contra una curva patrón generada para el analito de interés particular. En determinados casos, puede calcularse un valor de unidades computarizadas (UC) basándose en la curva patrón. En otros casos, el valor de UC puede expresarse como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" de acuerdo con la descripción anterior para intensidad de señal. El ejemplo 13 proporciona un ejemplo no limitante de análisis de datos para la cuantificación de proteínas de vías de transducción de señales (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) en células de cáncer gástrico.

60 En determinadas realizaciones, el nivel de expresión o activación de un analito de interés particular, cuando se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++", puede corresponder a un nivel de expresión o activación que es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces mayor o menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces mayor o menor) que un nivel de expresión o un nivel de activación de referencia, *por ejemplo*, cuando se compara con un control negativo, tal como un control de IgG, cuando se compara con una curva patrón generada para el analito de interés, cuando se compara con un control positivo, tal como un control pan-CK, cuando se compara con un nivel de expresión o activación determinado en presencia de un fármaco anticáncer y/o cuando se compara con un nivel de expresión o activación en ausencia de

un fármaco anticáncer. En algunos casos, la correlación es específica del analito. Como ejemplo no limitante, un nivel de expresión o activación "+" determinado usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede corresponder a un aumento de factor 2 en la expresión o activación para un analito y un aumento de factor 5 para otro analito cuando se compara con un nivel de expresión o activación de referencia.

5 En algunas realizaciones, se aísla la célula cancerosa de un sujeto que tiene el cáncer gástrico después de la administración de un fármaco anticáncer al sujeto. En otras realizaciones, se pone en contacto la célula cancerosa aislada con un fármaco anticáncer. En cualquiera de estas realizaciones, la respuesta del cáncer gástrico al tratamiento con el fármaco anticáncer puede identificarse comparando el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos generados en ausencia del fármaco anticáncer.

10 En determinadas realizaciones, la etapa (b) comprende aplicar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (a) para identificar la respuesta del cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer.

15 En una realización particular, la presente invención proporciona un método para identificar la respuesta de un cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

20 (a) aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 (b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en el extracto celular; y
 25 (d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para identificar si el cáncer gástrico es sensible o no sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer.

30 En otra realización particular, la presente invención proporciona un método para identificar la respuesta de un cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

35 (a) aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 (b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en el extracto celular;
 40 (d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer; y
 (e) indicar que el cáncer gástrico es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer) cuando el nivel de expresión y/o el nivel de activación determinado para los uno o más analitos está cambiado (por ejemplo, reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

45 En determinados casos, el cáncer gástrico es un adenocarcinoma. En otros casos determinados, el cáncer gástrico ha metastatizado al esófago, el intestino delgado, los nódulos linfáticos, órganos, hueso o combinaciones de los mismos.

50 En algunas realizaciones, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos se considera "cambiado" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%,
 55 80%, 85%, 90% o 95% más o menos activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En otras realizaciones, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos se considera "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% menos activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En realizaciones adicionales, se considera que el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de a ctivación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o m ás analitos está "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer (1) cuando se produce un cambio de expresión y/o activación alta o fuerte del analito sin el fármaco anticáncer a expresión y/o activación media, débil, baja o muy débil del analito con el fármaco anticáncer o (2) cuando se produce un c ambio de ex presión y/o activación media del analito sin el fármaco anticáncer a expresión y/o activación débil, baja o muy baja del analito con el fármaco anticáncer.

65

Para preservar los estados de activación *in situ*, las proteínas de transducción de señales se extraen típicamente poco después de que se aíslan las células, preferentemente a las 96, 72, 48, 24, 6 o 1 h, más preferentemente a los 30, 15 o 5 minutos. Las células aisladas también pueden incubarse con factores de crecimiento normalmente a concentraciones de nanomolar a micromolar durante aproximadamente 1-30 minutos para resucitar o estimular la activación del transductor de señales (véase, por ejemplo, Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)). Los factores estimulantes incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), herregulina (HGR), TGF- α , PIGF, angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, citocinas y similares. Para evaluar potenciales terapias anticáncer para un paciente individual, pueden incubarse las células aisladas con uno o más fármacos anticáncer a diversas dosis antes de, durante y/o después de la estimulación con factor de crecimiento. La estimulación con factores de crecimiento puede llevarse a cabo durante unos pocos minutos u horas (por ejemplo, aproximadamente 1-5 minutos a aproximadamente 1-6 horas). Tras el aislamiento, el tratamiento con el fármaco anticáncer y/o la estimulación con factor de crecimiento, se lisan las células para extraer las proteínas de transducción de señales usando cualquier técnica conocida en la materia. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente a los 1-5 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento; y (2) entre aproximadamente 30-180 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento. Como alternativa, el lisado puede almacenarse a -80°C hasta su uso.

En algunas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente que interfiere con la función de componentes de vías de transducción de señales activados en células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen aquellos listados en la tabla 1 anterior.

En otras realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasa; un agente anti-proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o suprimir el crecimiento no controlado de células aberrantes, tales como células cancerosas, tales como aquellos agentes anticáncer descritos anteriormente. En realizaciones adicionales, las células aisladas se tratan con uno o más agentes anti-señalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico, tal como aquellos fármacos anticáncer descritos anteriormente.

En determinadas realizaciones, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula normal, tal como una célula no cancerosa de un individuo sano que no tiene un cáncer, tal como cáncer gástrico. En otras realizaciones determinadas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico procedente de un paciente con un cáncer, tal como cáncer gástrico.

En algunas realizaciones, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula (por ejemplo, una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) que no se trata con el fármaco anticáncer. En realizaciones particulares, la célula que no se trata con el fármaco anticáncer se obtiene de la misma muestra que la célula aislada (por ejemplo, una célula de ensayo que se vaya a interrogar) usada para producir el extracto celular. En determinados casos, la presencia de un nivel de expresión o de activación menor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el cáncer gástrico es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer). En otros casos determinados, la presencia de un nivel de expresión o a ctivación idéntico, similar o mayor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el cáncer gástrico no es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad reducida de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer).

En realizaciones alternativas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula sensible al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En dichas realizaciones, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o menor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el cáncer gástrico es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer). En otras realizaciones alternativas determinadas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula resistente al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En dichas realizaciones, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o mayor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de

expresión o activación de referencia indica que el cáncer gástrico no es sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el tumor gástrico tiene una probabilidad reducida de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer).

5 En determinadas realizaciones, un mayor nivel de expresión o de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se considera que está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces mayor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces mayor) que el nivel de expresión o activación del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) no tratada con el fármaco anticáncer, en una célula sensible al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.

15 En otras realizaciones, un menor nivel de expresión o de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se considera que está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces menor) que el nivel de expresión o activación del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) no tratada con el fármaco anticáncer, en una célula sensible al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.

25 Los ejemplos no limitantes de analitos, tales como moléculas de transducción de señales que pueden interrogarse respecto de sus niveles de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) en un extracto celular incluyen aquellos analitos mostrados en la tabla 2 anterior, tales como, *por ejemplo*, tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

35 En una realización, los métodos de la presente invención comprenden determinar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de 1 o cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o de los 13 analitos siguientes en un extracto celular de acuerdo con las combinaciones descritas anteriormente: (1) HER1/EGFR/ErbB1; (2) HER2/ErbB2; (3) p95HER2; (4) HER3/ErbB3; (5) c-Met; (6) IGF1R; (7) cKit; (8) PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1); (9) Shc; (10) Akt; (11) p70S6K; (12) VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2 y/o VEGFR3); y (13) PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o PDGFRB).

40 En una realización particular, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, p95HER2 y HER3. En otra realización particular, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1) y Shc. En otra realización particular más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), Shc, Akt, p70S6K, VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B).

50 En determinadas realizaciones, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales en el extracto celular. En algunas realizaciones, los uno o más analitos adicionales comprenden una o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) moléculas de transducción de señales seleccionadas entre el grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

60 En realizaciones particulares, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de los siguientes analitos adicionales en un extracto celular: HER4, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, PDK2, GSK-3 β , Raf, SRC, NFkB-IkB, mTOR, EPH-A, EPH-B, EPH-C, EPH-D, FLT-3, TIE-1, TIE-2, c-FMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON, PIP2, PIP3, p27, proteína tirosina fosfatasa (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), dímeros de receptor, otros componentes de la vía de señalización de HER2, otros componentes de la vía de señalización de c-Met y combinaciones de los mismos.

65

En algunas realizaciones, la célula (por ejemplo, la célula de ensayo a partir de la cual se produce el extracto celular) es una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico. En determinados casos, la célula tumoral es una célula tumoral circulante o una célula de un aspirado con aguja fina (FNA) obtenida de un tumor. En otras realizaciones, la célula (por ejemplo, la célula de ensayo a partir de la cual se produce el extracto celular) se aísla de una muestra que se obtiene, *por ejemplo*, de un paciente de cáncer gástrico. Los ejemplos no limitantes de muestras incluyen muestras de fluidos corporales, tales como, por ejemplo, una muestra de sangre completa, suero, plasma, fluido de lavado ductal, aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva y/o aspirado con aguja fina (FNA). En realizaciones particulares, la muestra comprende una muestra de sangre completa, suero, plasma y/o tejido tumoral, tal como tejido de tumor gástrico.

En determinados casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además una etapa de proporcionar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) a un usuario (por ejemplo, un médico, tal como un oncólogo o médico de cabecera) en un formato legible. En algunos casos, el método puede comprender además enviar o comunicar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) a un médico, *por ejemplo*, un oncólogo o médico de cabecera. En otros casos, el método puede comprender además registrar o almacenar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) en una base de datos informática u otra máquina o dispositivo adecuado para almacenar información, *por ejemplo*, en un laboratorio.

En algunas realizaciones, la determinación del nivel de expresión de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende detectar la cantidad total de los uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para el analito correspondiente. En realizaciones particulares, los anticuerpos se unen al analito independientemente del estado de activación del analito que se vaya a detectar, *es decir*, los anticuerpos detectan las formas tanto activadas como no activadas del analito.

En otras realizaciones, la determinación de los niveles de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende detectar un nivel de fosforilación de los uno o más analitos en el extracto celular con anticuerpos específicos para la forma fosforilada de cada uno de los analitos que se vayan a detectar.

El nivel o estado de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel o estado de activación (por ejemplo, fosforilación) puede determinarse usando cualquiera de una serie de técnicas. En realizaciones particulares, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más de los analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) se detecta con un inmunoensayo, tal como un ensayo de detección individual o un ensayo de detección dual de proximidad (por ejemplo, un inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA, por sus siglas en inglés, Collaborative Proximity ImmunoAssay) como se describe en el presente documento.

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

(a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados entre el grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en un extracto celular producido a partir de una célula de cáncer aislada; y

(b) predecir la respuesta del sujeto que tiene el cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más de los analitos determinados en la etapa (a).

En algunas realizaciones, se expresa el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos como un valor de unidades relativas de fluorescencia (URF) que se corresponde a la intensidad de señal para un analito de interés particular que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo, tal como el inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA) descrito en el presente documento. En otras realizaciones, el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" que se corresponde con una intensidad de señal creciente para un analito de interés particular que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA. En algunos casos, un nivel no detectable o mínimamente detectable de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "-" o "±". En otros casos, un bajo nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "+". En otros casos más, un nivel moderado de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "++". En otros casos adicionales más, un alto nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "+++". En casos adicionales, un muy alto nivel de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede expresarse como "++++".

- En otras realizaciones más, el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos se cuantifica calibrando o normalizando el valor de UFR que se determina usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, contra una curva patrón generada para el analito de interés particular. En determinados casos, puede calcularse un valor de unidades computarizadas (UC) basándose en la curva patrón. En otros casos, el valor de UC puede expresarse como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" de acuerdo con la descripción anterior para intensidad de señal. El ejemplo 13 proporciona un ejemplo no limitante de análisis de datos para la cuantificación de proteínas de vías de transducción de señales (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) en células de cáncer gástrico.
- En determinadas realizaciones, el nivel de expresión o activación de un analito de interés particular, cuando se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++", puede corresponder a un nivel de expresión o activación que es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces mayor o menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces mayor o menor) que un nivel de expresión o un nivel de activación de referencia, *por ejemplo*, cuando se compara con un control negativo, tal como un control de IgG, cuando se compara con una curva patrón generada para el analito de interés, cuando se compara con un control positivo, tal como un control pan-CK, cuando se compara con un nivel de expresión o activación determinado en presencia de un fármaco anticáncer y/o cuando se compara con un nivel de expresión o activación en ausencia de un fármaco anticáncer. En algunos casos, la correlación es específica del analito. Como ejemplo no limitante, un nivel de expresión o activación "+" determinado usando, *por ejemplo*, un ensayo de proximidad, tal como COPIA, puede corresponder a un aumento de factor 2 en la expresión o activación para un analito y un aumento de factor 5 para otro analito cuando se compara con un nivel de expresión o activación de referencia.
- En algunas realizaciones, se aísla la célula cancerosa de un sujeto que tiene el cáncer gástrico después de la administración de un fármaco anticáncer al sujeto. En otras realizaciones, se pone en contacto la célula cancerosa aislada con un fármaco anticáncer. En cualquiera de estas realizaciones, la respuesta del sujeto que tiene cáncer gástrico al tratamiento con el fármaco anticáncer puede predecirse comparando el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos con un perfil de expresión y/o activación de referencia de los uno o más analitos generados en ausencia del fármaco anticáncer.
- En determinadas realizaciones, la etapa (b) comprende aplicar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (a) para predecir la respuesta del sujeto que tiene el cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer.
- En una realización particular, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto que tiene un cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:
- aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 - lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 - determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en el extracto celular; y
 - comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de los uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para predecir la probabilidad de que el sujeto que tiene el cáncer gástrico responda al tratamiento con el fármaco anticáncer.
- En otra realización particular, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto que tiene un cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:
- aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 - lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 - determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos seleccionados del grupo que consiste en HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en el extracto celular;
 - comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de los uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para predecir la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con el fármaco anticáncer; y
 - indicar que el sujeto que tiene el cáncer gástrico probablemente responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el sujeto que tiene el cáncer gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer) cuando el nivel de expresión y/o el nivel de activación determinado para los uno o más analitos está cambiado (por ejemplo, reducido sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En determinados casos, el cáncer gástrico es un adenocarcinoma. En otros casos determinados, el cáncer gástrico ha metastatizado al esófago, el intestino delgado, los nódulos linfáticos, órganos, hueso o combinaciones de los mismos.

- 5 En algunas realizaciones, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos se considera "cambiado" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% más o menos activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En otras realizaciones, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos se considera "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% menos activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En realizaciones adicionales, se considera que el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los uno o más analitos está "sustancialmente reducido" en presencia de un fármaco anticáncer (1) cuando se produce un cambio de expresión y/o activación alta o fuerte del analito sin el fármaco anticáncer a expresión y/o activación media, débil, baja o muy débil del analito con el fármaco anticáncer o (2) cuando se produce un cambio de expresión y/o activación media del analito sin el fármaco anticáncer a expresión y/o activación débil, baja o muy baja del analito con el fármaco anticáncer.

20 Para preservar los estados de activación *in situ*, las proteínas de transducción de señales se extraen típicamente poco después de que se aislen las células, preferentemente a las 96, 72, 48, 24, 6 o 1 h, más preferentemente a los 30, 15 o 5 minutos. Las células aisladas también pueden incubarse con factores de crecimiento normalmente a concentraciones de nanomolar a micromolar durante aproximadamente 1-30 minutos para resucitar o estimular la activación del transductor de señales (véase, por ejemplo, Irish et al., Cell, 118:217-228 (2004)). Los factores estimulantes incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), herregulina (HGR), TGF- α , PIGF, angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, citocinas y similares. Para evaluar potenciales terapias anticáncer para un paciente individual, pueden incubarse las células aisladas con uno o más fármacos anticáncer a diversas dosis antes de, durante y/o después de la estimulación con factor de crecimiento. La estimulación con factores de crecimiento puede llevarse a cabo durante unos pocos minutos u horas (por ejemplo, aproximadamente 1-5 minutos a aproximadamente 1-6 horas). Tras el aislamiento, el tratamiento con el fármaco anticáncer y/o la estimulación con factor de crecimiento, se lisan las células para extraer las proteínas de transducción de señales usando cualquier técnica conocida en la materia. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento y más preferentemente en dos intervalos de tiempo diferentes: (1) aproximadamente a los 1-5 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento; y (2) entre aproximadamente 30-180 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento. Como alternativa, el lisado puede almacenarse a -80°C hasta su uso.

En algunas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente que interfiere con la función de componentes de vías de transducción de señales activados en células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen aquellos listados en la tabla 1 anterior.

40 En otras realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasa; un agente anti-proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o suprimir el crecimiento no controlado de células aberrantes, tales como células cancerosas, tales como aquellos agentes anticáncer descritos anteriormente. En realizaciones adicionales, las células aisladas se tratan con uno o más agentes anti-señalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico, tal como aquellos fármacos anticáncer descritos anteriormente.

50 En determinadas realizaciones, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula normal, tal como una célula no cancerosa de un individuo sano que no tiene un cáncer, tal como cáncer gástrico. En otras realizaciones determinadas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico procedente de un paciente con un cáncer, tal como cáncer gástrico.

60 En algunas realizaciones, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula (por ejemplo, una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) que no se trata con el fármaco anticáncer. En realizaciones particulares, la célula que no se trata con el fármaco anticáncer se obtiene de la misma muestra que la célula aislada (por ejemplo, una célula de ensayo que se vaya a interrogar) usada para producir el extracto celular. En determinados casos, la presencia de un nivel de expresión o de activación menor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el sujeto que tiene el cáncer gástrico probablemente responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el sujeto que

tiene el cáncer gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer). En otros casos determinados, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o mayor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el sujeto que tiene el cáncer gástrico probablemente no responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el sujeto que tiene el cáncer gástrico tiene una probabilidad reducida de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer).

En realizaciones alternativas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula sensible al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En dichas realizaciones, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o menor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el sujeto que tiene el cáncer gástrico probablemente responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el sujeto que tiene el cáncer gástrico tiene una probabilidad aumentada de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer). En otras realizaciones alternativas determinadas, la expresión o el nivel de activación de referencia de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se obtiene de una célula resistente al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En dichas realizaciones, la presencia de un nivel de expresión o activación idéntico, similar o mayor de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el sujeto que tiene el cáncer gástrico probablemente no responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, el sujeto que tiene el cáncer gástrico tiene una probabilidad reducida de respuesta al tratamiento con el fármaco anticáncer).

En determinadas realizaciones, un mayor nivel de expresión o de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se considera que está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces mayor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces mayor) que el nivel de expresión o activación del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) no tratada con el fármaco anticáncer, en una célula sensible al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.

En otras realizaciones, un menor nivel de expresión o de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) determinado en la etapa (c) se considera que está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es de al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 veces menor (por ejemplo, aproximadamente 1,5-3, 2-3, 2-4, 2-5, 2-10, 2-20, 2-50, 3-5, 3-10, 3-20, 3-50, 4-5, 4-10, 4-20, 4-50, 5-10, 5-15, 5-20 o 5-50 veces menor) que el nivel de expresión o activación del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula de cáncer gástrico obtenida de una muestra de paciente) no tratada con el fármaco anticáncer, en una célula sensible al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.

Los ejemplos no limitantes de analitos, tales como moléculas de transducción de señales que pueden interrogarse respecto de sus niveles de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) en un extracto celular incluyen aquellos analitos mostrados en la tabla 2 anterior, tales como, *por ejemplo*, tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

En una realización, los métodos de la presente invención comprenden determinar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de 1 o cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o de los 13 analitos siguientes en un extracto celular de acuerdo con las combinaciones descritas anteriormente: (1) HER1/EGFR/ErbB1; (2) HER2/ErbB2; (3) p95HER2; (4) HER3/ErbB3; (5) c-Met; (6) IGF1R; (7) cKit; (8) PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1); (9) Shc; (10) Akt; (11) p70S6K; (12) VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2 y/o VEGFR3); y (13) PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o PDGFRB).

En una realización particular, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, p95HER2 y HER3. En otra realización particular, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1) y Shc. En otra realización particular más, la presente invención comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de HER1, HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), Shc, Akt, p70S6K, VEGFR (por ejemplo, VEGFR1,2 y/o 3) y PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B).

En determinadas realizaciones, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales en el extracto celular. En algunas realizaciones, los uno o más analitos adicionales comprenden una o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21,22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) moléculas de transducción de señales seleccionadas entre el grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

En realizaciones particulares, la presente invención comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de los siguientes analitos adicionales en un extracto celular: HER4, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, PDK2, GSK-3 β , Raf, SRC, NF κ B-I κ B, mTOR, EPH-A, EPH-B, EPH-C, EPH-D, FLT-3, TIE-1, TIE-2, c-FMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON, PIP2, PIP3, p27, proteína tirosina fosfatasas (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, *etc.*), dímeros de receptor, otros componentes de la vía de señalización de HER2, otros componentes de la vía de señalización de c-Met y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la célula (por ejemplo, la célula de ensayo a partir de la cual se produce el extracto celular) es una célula tumoral, tal como una célula de cáncer gástrico. En determinados casos, la célula tumoral es una célula tumoral circulante o una célula de un aspirado con aguja fina (FNA) obtenida de un tumor. En otras realizaciones, la célula (por ejemplo, la célula de ensayo a partir de la cual se produce el extracto celular) se aísla de una muestra que se obtiene, *por ejemplo*, de un paciente de cáncer gástrico. Los ejemplos no limitantes de muestras incluyen muestras de fluidos corporales, tales como, por ejemplo, una muestra de sangre completa, suero, plasma, fluido de lavado ductal, aspirado del pezón, linfa, aspirado de médula ósea, orina, saliva y/o aspirado con aguja fina (FNA). En realizaciones particulares, la muestra comprende una muestra de sangre completa, suero, plasma y/o tejido tumoral, tal como tejido de tumor gástrico.

En determinados casos, los métodos de la presente invención pueden comprender además una etapa de proporcionar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) a un usuario (por ejemplo, un médico, tal como un oncólogo o médico de cabecera) en un formato legible. En algunos casos, el método puede comprender además enviar o comunicar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) a un médico, *por ejemplo*, un oncólogo o médico de cabecera. En otros casos, el método puede comprender además registrar o almacenar el resultado de la comparación obtenida en la etapa (d) en una base de datos informática u otra máquina o dispositivo adecuado para almacenar información, *por ejemplo*, en un laboratorio.

En algunas realizaciones, la determinación del nivel de expresión de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende detectar la cantidad total de los uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para el analito correspondiente. En realizaciones particulares, los anticuerpos se unen al analito independientemente del estado de activación del analito que se vaya a detectar, *es decir*, los anticuerpos detectan las formas tanto activadas como no activadas del analito.

En otras realizaciones, la determinación de los niveles de activación de los uno o más analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-Met) en la etapa (c) comprende detectar un nivel de fosforilación de los uno o más analitos en el extracto celular con anticuerpos específicos para la forma fosforilada de cada uno de los analitos que se vayan a detectar.

El nivel o estado de expresión (por ejemplo, total) y/o el nivel o estado de activación (por ejemplo, fosforilación) puede determinarse usando cualquiera de una serie de técnicas. En realizaciones particulares, el nivel o estado de expresión (por ejemplo, total) y/o de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más de los analitos (por ejemplo, uno o más componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) en la etapa (c) se detecta con un inmunoensayo, tal como un ensayo de detección individual o un ensayo de detección dual de proximidad (por ejemplo, un inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA, por sus siglas en inglés, Collaborative Proximity ImmunoAssay) como se describe en el presente documento.

IV. Cánceres mediados por c-Met

c-Met puede estar sobreexpresado en muchas neoplasias malignas. En los cánceres mediados por c-Met, se han identificado mutaciones de amplificación y/o activación en el dominio de tirosina cinasa, el dominio yuxtapuesto al dominio de semaforina. Es posible seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer mediado por c-Met evaluando el nivel de expresión y/o el estado de activación de c-Met en presencia de agentes terapéuticos. La activación de c-Met da lugar a un crecimiento celular aumentado, invasión, angiogénesis y metástasis. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para seleccionar estrategias terapéuticas adecuadas para inhibir la activación y/o sobreexpresión de c-Met.

En una realización, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer mediado por c-Met, comprendiendo el método:

- 5 (a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente de uno o más analitos adicionales en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada; y
 (b) seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento del cáncer mediado por c-Met basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de los uno o más analitos determinados en la etapa (a).

10 En algunos casos, la presente invención proporciona un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer mediado por c-Met, comprendiendo el método:

- (a) aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 (b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 15 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales en el extracto celular; y
 (d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para
 20 determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer mediado por c-Met.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para identificar la respuesta de un cáncer mediado por c-Met al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- 25 (a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente de uno o más analitos adicionales en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada; y
 (b) identificar la respuesta del cáncer mediado por c-Met al tratamiento con un fármaco anticáncer basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más de los analitos determinados en la etapa (a).

30 En algunos casos, la presente invención proporciona un método para identificar la respuesta de un cáncer mediado por c-Met al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- (a) aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 35 (b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales en el extracto celular; y
 (d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de c-Met y
 40 opcionalmente uno o más analitos adicionales que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para identificar si el cáncer gástrico es sensible o no sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer.

En otra realización más, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto que tiene un cáncer mediado por c-Met al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- 45 (a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente de uno o más analitos adicionales en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada; y
 (b) predecir la respuesta del sujeto que tiene el cáncer mediado por c-Met al tratamiento con un fármaco anticáncer basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más de los analitos
 50 determinados en la etapa (a).

En algunos casos, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto que tiene un cáncer mediado por c-Met al tratamiento con un fármaco anticáncer, comprendiendo el método:

- 55 (a) aislar una célula cancerosa después de la administración de un fármaco anticáncer o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
 (b) lisar la célula aislada para producir un extracto celular;
 (c) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales en el extracto celular; y
 60 (d) comparar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales determinados en la etapa (c) con un perfil de expresión y/o activación de referencia de c-Met y opcionalmente uno o más analitos adicionales que se genera en ausencia del fármaco anticáncer para predecir la probabilidad de que el sujeto que tiene el cáncer gástrico responda al tratamiento con el fármaco anticáncer.

65 En determinados aspectos, la presente invención proporciona métodos para evaluar las vías del cáncer mediado por c-Met en muestras de pacientes, tales como células tumorales en circulación (CTC) o aspirados con aguja fina

(FNA). Los métodos del presente documento proporcionan una estrategia terapéutica óptima para el paciente. En un aspecto, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más de los siguientes analitos adicionales pueden explorarse o interrogarse para determinar la respuesta a una terapia para un cáncer mediado por c-Met (por ejemplo, un inhibidor de c-Met): HER1, HER2, p95HER2, HER3, IGF1R, cKit, PI3K (por ejemplo, PIK3CA, PIK3R1), Shc, Akt (por ejemplo, Akt1, Akt2, Akt3), p70S6K, VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3), PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), RON y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un respondedor a XL-880 tiene c-MET y VEGFR2 activados, mientras que un no respondedor puede tener una combinación de RTK activadas.

En otros casos determinados, los métodos proporcionados en el presente documento son útiles para seleccionar una terapia combinada para el tratamiento del cáncer gástrico. Por ejemplo, puede tratarse exitosamente a pacientes de cáncer gástrico con c-MET, VEGFR2, y EGFR activados con una combinación de Iressa® y XL880, aunque puede tratarse a pacientes con c-MET, VEGFR2, HER1, HER2, p95HER2 y HER3 activados con Tykerb® + XL880.

En células tumorales, se cree que la activación de c-Met provoca el desencadenamiento de una serie diversa de cascadas de señalización que dan como resultado un crecimiento celular, proliferación, invasión y protección frente a la apoptosis. Los datos de modelos de tumor celulares y animales sugieren que los mecanismos biológicos subyacentes a la tumorigenicidad de los cánceres mediados por c-Met se logran típicamente de tres maneras distintas: (1) con el establecimiento de bucles autocrinos de HGF/c-Met; (2) mediante la sobreexpresión de c-Met o HGF; y (3) en presencia de mutaciones activantes de cinasas en la secuencia codificante del receptor c-Met. La sobreexpresión de HGF y c-Met es indicativa de una mayor agresividad de los tumores y malas señales pronósticas en los pacientes con cáncer. La señalización de HGF/c-Met induce la angiogénesis tumoral induciendo la proliferación y migración de células endoteliales, induciendo la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un factor proangiogénico clave, así como regulando negativamente de manera dramática la trombospondina 1 (TSP-1), un regulador negativo de la angiogénesis. Se ha observado la expresión de HGF y c-Met en biopsias tumorales de la mayoría de tumores sólidos y se ha documentado la señalización de c-Met en una gran variedad de neoplasias malignas humanas, incluyendo cánceres de estómago (gástricos), vejiga, mama, cuello de útero, colorrectal, gástrico, cabeza y cuello, hígado, pulmón, ovario, pancreático, próstata, renal y tiroides, así como en diversos sarcomas, neoplasias hematopoyéticas y melanoma. De manera más destacable, se han identificado mutaciones activantes en el dominio de tirosina cinasa de c-Met en pacientes con una forma hereditaria de cáncer renal papilar, lo que implica directamente a c-Met en la tumorigénesis humana.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para detectar los estados de activación y expresión de c-Met y opcionalmente una diversidad de transductores de señal desregulados, en células tumorales procedentes de tejido tumoral o células circulantes de un tumor sólido en un ensayo específico, multiplexado, de alto rendimiento. La presente invención también proporciona métodos y composiciones para la selección de terapias adecuadas para regular negativamente o desactivar una o más vías de señalización desreguladas. Por lo tanto, las realizaciones de la invención pueden usarse para facilitar el diseño de terapias personalizadas basándose en la firma molecular particular proporcionada por la colección de proteínas de transducción de señales activadas en un tumor dado de un paciente, tal como un tumor gástrico.

En algunas realizaciones, el fármaco anticáncer (por ejemplo, uno o más fármacos anticáncer adecuados para el tratamiento de un cáncer mediado por c-Met, tal como cáncer gástrico) comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasa; un agente anti-proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o suprimir el crecimiento no controlado de células aberrantes, tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, las células aisladas se tratan con uno o más agentes anti-señalización, agentes anti-proliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo, tal como un anticuerpo específico para HGF o c-Met previene la unión de ligando/receptor, dando como resultado la inhibición del crecimiento y la regresión tumoral inhibiendo la proliferación y potenciando la apoptosis. En algunos casos, también puede usarse una combinación de anticuerpos monoclonales. La estrategia de usar anticuerpos monoclonales permite una especificidad exclusiva contra HGF/c-Met, una semivida relativamente larga en comparación con inhibidores de cinasa de molécula pequeña y el potencial de desencadenar una respuesta inmunitaria del hospedador contra las células tumorales. AMG102 es un anticuerpo monoclonal de IgG2 completamente humano que se une selectivamente y neutraliza al HGF, previniendo de este modo su unión a y la posterior activación de c-Met. Se ha demostrado que AMG102 potencia los efectos de diversos agentes quimioterapéuticos convencionales, tales como temozolomida y docetaxel *in vitro* y en xenoinjertos cuando se combinan. MetMab es un anticuerpo humanizado, monovalente agonista anti-c-Met obtenido del anticuerpo agonista monoclonal 5D5. MetMab se une a c-Met con una alta afinidad y permanece sobre la superficie celular con c-Met, impidiendo la unión de HGF y la posterior fosforilación de c-Met, así como la actividad de señalización aguas abajo y las respuestas celulares. Estudios preclínicos recientes demuestran que MetMab es un potente inhibidor anti c-Met que es prometedor como anticuerpo terapéutico en cánceres humanos, especialmente en combinación con inhibidores de EGFR y/o VEGF.

Los inhibidores de molécula pequeña de c-Met incluyen, pero sin limitación, ARQ197 (ArQule), que es un agente no competitivo con el ATP altamente selectivo por el receptor c-Met. Otros inhibidores de c-Met selectivos han entrado recientemente en evaluaciones clínicas iniciales e incluyen: JNJ-38877605 (Johnson & Johnson), que es un inhibidor de molécula pequeña competitivo con el ATP de la actividad catalítica de c-Met; PF-04217903 (Pfizer), que es un inhibidor c-Met de molécula pequeña disponible por vía oral competitivo con el ATP con una selectividad de > 1000 veces por c-Met en comparación con un panel de exploración de > 150 proteína cinasas; SGX523 (SGX Pharmaceuticals), que es otro inhibidor de c-Met altamente selectivo competitivo con el ATP con una selectividad de > 1000 veces por c-Met frente a otras cinasas en un panel de exploración de 213 proteína cinasas y una potente actividad antitumoral cuando se dosifica por vía oral en modelos de xenoinjerto humano sin una toxicidad evidente.

GSK 1363089/XL880 (Exelixis) es otro ejemplo de un inhibidor de c-Met de molécula pequeña que se dirige a c-Met con una IC_{50} de 0,4 nM. La afinidad de unión es alta tanto para c-Met como para VEGFR2, provocando un cambio conformacional e la cinasa para mover a XL880 más profundamente en el bolsillo de unión a ATP. El tiempo sobre la diana es > 24 horas para ambos receptores. XL880 tiene una buena biodisponibilidad oral y es un sustrato de CYP450, pero no un inhibidor o inductor. Dos ensayos clínicos de fase I examinaron diferentes pautas de administración de XL880, tanto en una pauta de 5 días de administración/9 días de descanso (estudio 1) o en forma de una dosis diaria fija (estudio 2). XL880 actúa sobre dos vías cooperativas para la proliferación y supervivencia en diferentes instantes, proporcionando una solución terapéutica para la respuesta tumoral al asalto inicial de la angiogénesis tumoral. Los ensayos de fase II han comenzado en múltiples tipos de tumor, incluyendo cáncer papilar renal, cáncer gástrico y cánceres de cabeza y cuello.

XL 184 (Exelixis) es un nuevo compuesto anticáncer, administrado por vía oral, de molécula pequeña que, en modelos preclínicos, ha demostrado una potente inhibición tanto de c-MET como de VEGFR2. MP470 (SuperGen) es una nueva molécula pequeña biodisponible por vía oral con actividad inhibitoria contra c-Met así como varias otras dianas de proteína tirosina cinasa, incluyendo formas mutantes de c-Kit, PDGFRa mutante y Flt-3 mutante. MGCD265 (Methylgene) inhibe potentemente las actividades enzimáticas de c-Met, Ron, VEGFR y Tie-2 *in vitro* y se ha comunicado que suprime criterios de valoración celulares dependientes de HGF, tales como la dispersión y curación de heridas, así como respuestas dependientes de VEGF, tales como la angiogénesis *in vitro* y la permeabilidad vascular *in vivo*. MK-2461 (Merck) es un potente inhibidor de c-Met, KDR, FGFR1/2/3 y Flt 1/3/4 que es especialmente activo en modelos preclínicos con amplificación del gen MET, en los que c-Met está fosforilado de manera constitutiva. MK-2461 se ha tolerado bien en la evaluación temprana de fase I.

En determinados casos, la unión del ligando HGF al receptor c-Met puede inhibirse mediante subregiones de HGF o c-Met que pueden actuar como señuelos o antagonistas. Estos señuelos y antagonistas compiten estequiométricamente con el ligando o el receptor sin dar lugar a la activación de c-Met, impidiendo de este modo la activación de vías y resultados biológicos aguas abajo. Se han validado experimentalmente varias variantes de HGF y c-Met como antagonistas tanto *in vitro* como *in vivo* y funcionan bloqueando la unión de ligando o impidiendo la dimerización de c-Met. Además, se han desarrollado análogos moleculares para el HGF que han demostrado que compiten con el HGF por la unión a c-Met.

V. Construcción de matrices de anticuerpos

En determinados aspectos, el nivel de expresión y/o el estado de activación de uno o más (por ejemplo, una diversidad) de analitos (por ejemplo, moléculas de transducción de señales) en un extracto celular o en células tumorales, tales como células de cáncer gástrico, se detecta usando una matriz basada en anticuerpos que comprende una dilución en serie de anticuerpos de captura retenidos sobre un soporte sólido. Las matrices comprenden típicamente una serie de diferentes anticuerpos de captura a una serie de concentraciones de anticuerpo de captura que están acoplados a la superficie del soporte sólido en ubicaciones abordables.

En una realización particular, la presente invención proporciona una matriz abordable que tiene un intervalo dinámico superior que comprende una diversidad de diluciones en serie de anticuerpos de captura retenidos sobre un soporte sólido, en la que los anticuerpos de captura en cada dilución en serie son específicos para uno o más analitos correspondientes a un componente de una vía de transducción de señales y otras proteínas diana. En varios aspectos, esta realización incluye matrices que comprenden componentes de vías de transducción de señales características de tumores concretos, *por ejemplo*, vías de transducción de señales activas en células cancerosas (por ejemplo, las vías de HER2 y/o c-Met). Por lo tanto, la presente invención puede ponerse en práctica ventajosamente en donde cada molécula de transducción de señales u otra proteína de interés con un defecto de expresión o activación potencial que causa cáncer gástrico está representada sobre una sola matriz o chip. En algunos aspectos, los componentes de una vía de transducción de señales dada activa en una célula tumoral particular se disponen en una secuencia lineal que corresponde a la secuencia en la que se dispone la información a lo largo de una vía de transducción de señales en una célula. Los ejemplos de dichas matrices se describen en el presente documento y también se muestran en las figuras 5-9 de la publicación PCT n.º WO2009/108637. Los anticuerpos de captura específicos para uno o más componentes de una vía de transducción de señales dada activa en una célula tumoral particular también pueden imprimirse de un modo aleatorio para minimizar cualquier falso positivo relacionado con la superficie.

- El soporte sólido puede comprender cualquier sustrato adecuado para inmovilizar proteínas. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, pinchos, filtros, perlas, papel, membranas, ovillos de fibras, geles, metales, cerámica y similares. Las membranas, tal como de nailon (Biotrans™, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), nitrocelulosa (Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) y PVDF (Immobilon™, Millipore Corp. (Billerica, MA)) son adecuadas para su uso como soportes sólidos en las matrices de la presente invención. Preferentemente, los anticuerpos de captura se retienen sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, *por ejemplo*, portaobjetos FAST®, que están disponibles comercialmente de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).
- Los aspectos particulares del soporte sólido que son deseables incluyen la capacidad de unirse a grandes cantidades de anticuerpos de captura y la capacidad para unirse a anticuerpos de captura con una desnaturalización mínima. Otro aspecto adecuado es que el soporte sólido muestra un "mechado" mínimo cuando se aplican al soporte soluciones de anticuerpo que contienen anticuerpos de captura. Un soporte sólido con un mechado mínimo permite la aplicación de pequeñas alícuotas de anticuerpo de captura al soporte para dar como resultado puntos pequeños definidos de anticuerpo de captura inmovilizado.
- Los anticuerpos de captura se retienen típicamente directa o indirectamente (por ejemplo, mediante marcadores de captura) sobre el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En algunas realizaciones, los anticuerpos de captura están unidos covalentemente al soporte sólido usando un reticulante homobifuncional o heterobifuncional usando métodos y condiciones de reticulación convencionales. Los reticulantes adecuados están disponibles comercialmente de comercializadores tales como, *por ejemplo*, Pierce Biotechnology (Rockford, IL).
- Los métodos para generar matrices adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, cualquier técnica usada para construir matrices de proteína o ácido nucleico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de captura se puntean sobre una matriz usando un micropunteador, que típicamente son impresoras robóticas equipadas con puntas divididas, puntas romas o impresión por chorro de tinta. Los sistemas robóticos adecuados para imprimir las matrices de anticuerpo descritas en el presente documento incluyen el robot PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) con puntas divididas ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA) así como otras impresoras robóticas disponibles de BioRobics (Woburn, MA) y Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferentemente, se puntean al menos 2, 3, 4, 5 o 6 replicados de cada dilución de anticuerpo de captura sobre la matriz.
- Otro método para generar matrices adecuadas para su uso en la presente invención comprende dispensar un volumen conocido de una dilución de anticuerpo de captura en cada posición seleccionada de la matriz poniendo en contacto un dispensador capilar sobre un soporte sólido en condiciones eficaces para depositar un volumen definido de líquido sobre el soporte, en el que este proceso se repite usando diluciones de anticuerpo de captura seleccionadas en cada posición seleccionada de la matriz para crear una matriz completa. El método puede ponerse en práctica para formar una pluralidad de dichas matrices, donde la etapa de deposición de la solución se aplica en una posición seleccionada sobre una pluralidad de soporte sólidos en cada ciclo repetido. Puede obtenerse una descripción adicional de dicho método, *por ejemplo*, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.807.522.
- En determinados casos, pueden usarse dispositivos para imprimir en papel para generar las matrices de anticuerpo. Por ejemplo, puede cargarse la dilución de anticuerpo de captura deseada en el cabezal de impresión de una impresora de chorro de escritorio e imprimir sobre un soporte sólido adecuado (véase, por ejemplo, Silzel et al., Clin. Chem., 44:2036-2043 (1998)).
- En algunas realizaciones, la matriz generada sobre el soporte sólido tiene una densidad de al menos aproximadamente 5 puntos/cm² y preferentemente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 o 10.000 puntos/cm².
- En determinados casos, los puntos sobre el soporte sólido representan cada uno un anticuerpo de captura diferente. En otros casos determinados, múltiples puntos sobre el soporte sólido representan el mismo anticuerpo de captura, *por ejemplo*, en forma de una dilución en serie que comprende una serie de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura.
- Se describen ejemplos adicionales de métodos para preparar y construir matrices de anticuerpos en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.197.599, 6.777.239, 6.780.582, 6.897.073, 7.179.638 y 7.192.720; las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20060115810, 20060263837, 20060292680 y 20070054326; y Varnum et al., Methods Mol. Biol., 264:161-172 (2004).
- Se conocen métodos para escanear matrices de anticuerpos e incluyen, sin limitación, cualquier técnica usada para escanear matrices de proteínas o ácidos nucleicos. Los escáneres de micromatrices adecuados para su uso en la presente invención están disponibles de PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied

Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA) y Axon Instruments (Union City, CA). Como ejemplo no limitante, puede usarse un GSI ScanArray3000 para la detección de fluorescencia con el programa informático ImaGene para la cuantificación.

5 VI. Ensayos de detección individuales

En algunas realizaciones, el ensayo para detectar el nivel de expresión y/o activación de uno o más analitos (por ejemplo, una o más moléculas de transducción de señales, tales como uno o más componentes de las vías de señalización de HER2 y/o c-Met) de interés en un extracto celular de células, tales como células tumorales, es un ensayo multiplexado de alto rendimiento con dos anticuerpos que tiene un intervalo dinámico superior. Como ejemplo no limitante, los dos anticuerpos usados en el ensayo pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para un analito particular de interés; y (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación puede detectar, por ejemplo, el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o complejación del analito. Como alternativa, el anticuerpo de detección comprende un anticuerpo independiente del estado de activación, que detecta la cantidad total del analito en el extracto celular. El anticuerpo independiente del estado de activación generalmente es capaz de detectar las formas tanto activadas como no activadas del analito.

En una realización particular, el ensayo de dos anticuerpos para detectar el nivel de expresión o activación de un analito de interés comprende:

- (i) incubar el extracto celular con una diversidad de diluciones en serie de anticuerpos de captura para formar una diversidad de analitos capturados;
- (ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección específicos para los analitos correspondientes para formar una diversidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de detección comprenden anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) del analito o anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) del analito;
- (iii) incubar la pluralidad de analitos capturados detectables con primeros y segundos miembros de un par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

Los ensayos con dos anticuerpos descritos en el presente documento son típicamente matrices a base de anticuerpos que comprenden una diversidad de diferentes anticuerpos de captura a un intervalo de concentraciones de anticuerpo de captura que están acoplados a la superficie de un soporte sólido en diferentes ubicaciones abordables. Los ejemplos de soportes sólidos adecuados para su uso en la presente invención se han descrito con anterioridad.

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

En una realización, los anticuerpos de detección comprenden un primer miembro de un par de unión (por ejemplo, biotina) y el primer miembro del par de amplificación de la señal comprende un segundo miembro del par de unión (por ejemplo, estreptavidina). Los miembros del par de unión pueden acoplarse directa o indirectamente a los anticuerpos de detección o al primer miembro del par de amplificación de la señal usando métodos de sobra conocidos en la técnica. En determinados casos, el primer miembro del par de amplificación de señales es una peroxidasa (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, peroxidasa de eosinófilos, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa de tiroideos, desionasa, etc.) y el segundo miembro del par de amplificación de la señal es un reactivo de tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida). En estos casos, la señal amplificada se genera mediante oxidación con peroxidasa del reactivo de tiramida para producir una tiramida activada en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

La tiramida activada se detecta directamente o se detecta tras la adición de un reactivo de detección de señales, tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Los ejemplos de fluoróforos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, un tinte Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, rojo Texas, isocianato de tetraarrodamina (TRITC), un fluoróforo CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similares. El marcador de estreptavidina puede acoplarse directa o indirectamente al fluoróforo o la peroxidasa usando métodos de sobra conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de reactivos cromogénicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

65

Un protocolo ilustrativo para llevar a cabo los ensayos de dos anticuerpos descritos en el presente documento se proporciona en el ejemplo 3 de la Publicación PCT n.º WO2009/108637.

En otra realización de una estrategia de dos anticuerpos, la presente invención proporciona un método para detectar la expresión o el nivel de activación de un receptor truncado, comprendiendo el método:

- (i) incubar el extracto celular con una diversidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) de un receptor de longitud completa;
- (ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa para formar un extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa;
- (iii) incubar el extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa con una dilución en serie de uno o una diversidad de anticuerpos de captura específicos para una región de unión a dominio intracelular del receptor de longitud completa para formar una diversidad de receptores truncados capturados;
- (iv) incubar la diversidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección específicos para una región de unión a ICD del receptor de longitud completa para formar una diversidad de receptores truncados capturados detectables, en el que los anticuerpos de detección comprenden anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) del receptor truncado o anticuerpos independientes del estado de activación para detectar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) del receptor truncado;
- (v) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con primeros y segundos miembros de un par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y
- (vi) detectar una señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

En determinadas realizaciones, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otras realizaciones determinadas, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) comprende un par de estreptavidina-biotina, en el que la biotina está unida a la perla y la biotina está unida al anticuerpo (por ejemplo, en el que el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa).

La figura 14A de la Publicación PCT n.º WO2009/108637 muestra que las perlas recubiertas con un anticuerpo dirigido al dominio extracelular (ECD) de un receptor de interés se une al receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2), pero no al receptor truncado (por ejemplo, p95HER2) para eliminar cualquier receptor de longitud completa del ensayo. La figura 14B de la Publicación PCT n.º WO2009/108637 muestra que el receptor truncado (por ejemplo, p95HER2), una vez unido a un anticuerpo de captura, puede detectarse mediante un anticuerpo de detección que es específico para el dominio intracelular (ICD) del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2). El anticuerpo de detección puede conjugarse directamente a peroxidasa de rábano picante (HRP). Después, puede efectuarse una amplificación de la señal de tiramida (TSA) para generar una señal que se vaya a detectar. El nivel de expresión o el estado de activación del receptor truncado (por ejemplo, p95HER2) puede interrogarse para determinar, *por ejemplo*, su concentración total o su estado de fosforilación, su estado de ubiquitinación y/o su estado de complejación.

En otra realización, la presente invención proporciona kits para llevar a cabo los ensayos de dos anticuerpos descritos anteriormente que comprenden: (a) una dilución en serie de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura retenidos sobre un soporte sólido; y (b) uno o una diversidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para métodos de uso del kit para detectar los niveles de expresión y/o los estados de activación de una o una diversidad de moléculas de transducción de señales de células, tales como células tumorales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales descritos anteriormente para llevar a cabo los métodos específicos de la presente invención, tales como, por ejemplo, primeros y segundos miembros del par de amplificación de la señal, reactivos de amplificación de la señal de tiramida, tampones de lavado, etc.

VII. Ensayos de detección dual de proximidad

En algunas realizaciones, el ensayo para detectar el nivel de expresión y/o activación de uno o más analitos (por ejemplo, una o más moléculas de transducción de señales, tales como uno o más componentes de las vías de señalización de HER2 y/o c-Met) de interés en un extracto celular de células, tales como células tumorales es un ensayo multiplexado, de alto rendimiento de proximidad (es decir, de tres anticuerpos) que tiene un intervalo dinámico superior. Como ejemplo no limitante, los tres anticuerpos usados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para un analito particular de interés; (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del analito (es decir, anticuerpo dependiente del estado de activación); y (3) un anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, anticuerpo independiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación puede detectar, *por ejemplo*, el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o complejación del analito, mientras que el anticuerpo independiente del estado de activación es capaz de detectar la cantidad total (es decir, las formas tanto activadas como no activadas) del analito.

En una realización particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel o estado de activación de un analito de interés comprende:

- 5 (i) incubar el extracto celular con una diversidad de diluciones en serie de anticuerpos de captura para formar una diversidad de analitos capturados;
- (ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una diversidad de anticuerpos independientes del estado de activación y uno o una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes para formar una pluralidad de analitos detectables capturados,
- 10 en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;
- 15 (iii) incubar la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

20 En otra realización particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel o estado de activación de un analito de interés que es un receptor truncado comprende:

- (i) incubar el extracto celular con una diversidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) de un receptor de longitud completa;
- 25 (ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa para formar un extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa;
- (iii) incubar el extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa con uno o una diversidad de anticuerpos de captura específicos para una región de unión a dominio intracelular del receptor de longitud completa para formar una diversidad de receptores truncados capturados;
- 30 (iv) incubar la diversidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una diversidad de anticuerpos independientes del estado de activación y uno o una diversidad de anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para una región de unión a ICD del receptor de longitud completa para formar una diversidad de receptores truncados capturados detectables, en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;
- 35 (v) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
- 40 (vi) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

En determinadas realizaciones, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otras realizaciones determinadas, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) comprende un par de estreptavidina-biotina, en el que la biotina está unida a la perla y la biotina está unida al anticuerpo (por ejemplo, en el que el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa).

En realizaciones alternativas, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse con un resto facilitante y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un primer miembro de un par de amplificación de la señal.

Como otro ejemplo no limitante, los tres anticuerpos usados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para un analito particular de interés; (2) un primer anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, un primer anticuerpo independiente del estado de activación); y (3) un segundo anticuerpo de detección que detecta la cantidad total del analito (es decir, un segundo anticuerpo independiente del estado de activación). En realizaciones preferidas, los primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación reconocen epítomos diferentes (por ejemplo, distintos) sobre el analito.

En una realización particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel de expresión de un analito de interés comprende:

- (i) incubar el extracto celular con una diversidad de diluciones en serie de anticuerpos de captura para formar una diversidad de analitos capturados;
- 65 (ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una diversidad de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes para formar una diversidad de analitos detectables capturados,

en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

5 (iii) incubar la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y

(iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

10 En otra realización particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel de expresión de un analito de interés que es un receptor truncado comprende:

(i) incubar el extracto celular con una diversidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) de un receptor de longitud completa;

15 (ii) retirar la pluralidad de perlas del extracto celular, retirando de este modo el receptor de longitud completa para formar un extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa;

(iii) incubar el extracto celular desprovisto del receptor de longitud completa con uno o una diversidad de anticuerpos de captura específicos para una región de unión a dominio intracelular del receptor de longitud completa para formar una diversidad de receptores truncados capturados;

20 (iv) incubar la diversidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una diversidad de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para una región de unión a ICD del receptor de longitud completa para formar una diversidad de receptores truncados capturados detectables,

25 en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;

(v) incubar la pluralidad de receptores truncados capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y

30 (vi) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

35 En determinadas realizaciones, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otras realizaciones determinadas, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) comprende un par de estreptavidina-biotina, en el que la biotina está unida a la perla y la biotina está unida al anticuerpo (por ejemplo, en el que el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa).

40 En realizaciones alternativas, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y los segundos anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un resto facilitante.

45 Los ensayos de proximidad descritos en el presente documento son típicamente matrices a base de anticuerpos que comprenden uno o una diversidad de diferentes anticuerpos de captura a un intervalo de concentraciones de anticuerpo de captura que están acoplados a la superficie de un soporte sólido en diferentes ubicaciones abordables. Los ejemplos de soportes sólidos adecuados para su uso en la presente invención se han descrito con anterioridad.

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

55 En algunas realizaciones, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de activación de uno o más de los analitos o, como alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión de uno o más de los analitos comprenden además un resto detectable. En dichos casos, la cantidad del resto detectable es correlativa a la cantidad de uno o más de los analitos en el extracto celular. Los ejemplos de restos detectables incluyen, pero sin limitación, marcadores fluorescentes, marcadores químicamente reactivos, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos y similares. Preferentemente, el resto detectable es un fluoróforo, tal como un tinte Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 647), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, rojo Texas, isocianato de tetrarrodamina (TRITC), un fluoróforo CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similares. El resto detectable puede acoplarse directa o indirectamente a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos de sobra conocidos en la técnica.

65

En determinados casos, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de activación de uno o más de los analitos o, como alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión de uno o más de los analitos se marcan directamente con el resto facilitante. El resto facilitante puede acoplarse a anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos de sobra conocidos en la técnica. Un resto facilitante adecuado para su uso en la presente invención incluye cualquier molécula que pueda generar un agente oxidante que va a (es decir, está dirigido a) y reacciona con (es decir, se une, está unido a o forma un complejo con) otra molécula en proximidad (es decir, espacialmente próxima o cercana) al resto facilitante. Los ejemplos de restos facilitantes incluyen, sin limitación, enzimas, tales como glucosa oxidasa o cualquier otra enzima que catalice una reacción de oxidación/reducción que implique oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones y fotosensibilizantes, tales como azul de metileno, rosa de bengala, porfirinas, tintes de escuarato, ftalocianinas y similares. Los ejemplos no limitantes de agentes oxidantes incluyen peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un oxígeno singlete y cualquier otro compuesto que transfiera átomos de oxígeno o gane electrones en una reacción de oxidación/reducción. Preferentemente, en presencia de un sustrato adecuado (por ejemplo, glucosa, luz, etc.), el resto facilitante (por ejemplo, glucosa oxidasa, fotosensibilizante, etc.) genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno singlete, etc.) que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), hapteno protegido por un grupo protector, una enzima inactivada mediante enlace tioéter a un inhibidor enzimático, etc.) cuando los dos restos se encuentran próximos entre sí.

En otros casos determinados, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de activación de uno o más de los analitos o, como alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión de uno o más de los analitos están marcados indirectamente con el resto facilitante mediante hibridación entre un enlazador oligonucleotídico conjugado a los anticuerpos independientes del estado de activación y un enlazador oligonucleotídico complementario conjugado al resto facilitante. Los enlazadores oligonucleotídicos pueden acoplarse al resto facilitante o a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos de sobra conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el enlazador oligonucleotídico conjugado al resto facilitante tiene una complementariedad del 100% respecto del enlazador oligonucleotídico conjugado a los anticuerpos independientes del estado de activación. En otras realizaciones, el par de enlazador oligonucleotídico comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones desemparejadas, *por ejemplo*, tras hibridar en condiciones de hibridación rigurosas. Un experto en la materia apreciará que los anticuerpos independientes del estado de activación específicos para diferentes analitos pueden estar conjugados al mismo enlazador oligonucleotídico o a diferentes enlazadores oligonucleotídicos.

La longitud de los enlazadores oligonucleotídicos que se conjugan al resto facilitante o a los anticuerpos independientes del estado de activación puede variar. En general, la secuencia enlazadora puede tener al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos de longitud. Típicamente, se generan para su acoplamiento secuencias de ácido nucleico al azar. Como ejemplo no limitante, puede diseñarse una biblioteca de enlazadores oligonucleotídicos para que tengan tres dominios contiguos distintos: un dominio espaciador; dominio de firma; y dominio de conjugación. Preferentemente, los enlazadores oligonucleotídicos se diseñan para un acoplamiento eficaz sin destruir la función del resto facilitante o de los anticuerpos independientes del estado de activación a los que se conjugan.

Las secuencias de enlazador oligonucleotídico pueden diseñarse para prevenir o minimizar cualquier formación de estructura secundaria en una serie de condiciones de ensayo. Normalmente, se monitorizan con cuidado las temperaturas de fusión para cada segmento dentro del enlazador para permitir su participación en los procedimientos de ensayo generales. En general, el intervalo de temperaturas de fusión del segmento de la secuencia enlazadora es de entre 1-10°C. Pueden emplearse algoritmos informáticos (por ejemplo, OLIGO 6.0) para determinar la temperatura de fusión, la estructura secundaria y la estructura de horquilla a concentraciones iónicas definidas para analizar cada uno de los tres dominios diferentes en cada enlazador. Las secuencias combinadas generales también pueden analizarse respecto de su caracterización estructural y su comparabilidad con otras secuencias enlazadoras oligonucleotídicas conjugadas, *por ejemplo*, para saber si hibridarán en condiciones de hibridación rigurosas a un enlazador oligonucleotídico complementario.

La región espaciadora del enlazador oligonucleotídico proporciona una separación adecuada del dominio de conjugación del sitio de sobrecruzamiento del oligonucleótido. El dominio de conjugación funciona enlazando moléculas marcadas con una secuencia enlazadora oligonucleotídica complementaria al dominio de conjugación mediante hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación mediada por ácido nucleico puede llevarse a cabo antes o después de la formación del complejo anticuerpo-analito (es decir, antígeno), proporcionando un formato de ensayo más flexible. A diferencia de muchos métodos de conjugación directa de anticuerpos, el enlace de oligonucleótidos relativamente pequeños a anticuerpos u otras moléculas tiene un impacto mínimo en la afinidad específica de los anticuerpos frente a su analito diana o sobre la función de las moléculas conjugadas.

En algunas realizaciones, el dominio de secuencia de firma del enlazador oligonucleotídico puede usarse en complejos ensayos de proteínas multiplexados. Pueden conjugarse múltiples anticuerpos a enlazadores oligonucleotídicos con diferentes secuencias de firma. En los inmunoensayos multiplexados, pueden usarse secuencias oligonucleotídicas indicadoras marcadas con sondas adecuadas para detectar reactividad cruzada entre

anticuerpos y sus antígenos en el formato de ensayo multiplexado.

Pueden conjugarse enlazadores oligonucleotídicos a anticuerpos u otras moléculas usando varios métodos diferentes. Por ejemplo, pueden sintetizarse enlazadores oligonucleotídicos con un grupo tiol en cualquiera de los extremos 5' o 3'. El grupo tiol puede desprotegerse usando agentes reductores (por ejemplo, TCEP-HCl) y pueden purificarse los enlazadores resultantes usando una columna desaladora de centrifugación. Los enlazadores oligonucleotídicos desprotegidos resultantes pueden conjugarse a las aminas primarias de anticuerpos u otros tipos de proteínas usando reticulantes heterobifuncionales, tales como SMCC. Como alternativa, pueden tratarse los grupos 5'-fosfato sobre los oligonucleótidos con carbodiimida hidrosoluble EDC para formar ésteres de fosfato y posteriormente acoplarlos a moléculas que contienen amina. En determinados casos, el diol en el resto de 3'-ribosa puede oxidarse a grupos aldehído y después conjugarse a los grupos amina de los anticuerpos u otros tipos de proteína usando aminación reductora. En otros casos determinados, el enlazador oligonucleotídico puede sintetizarse con una modificación de biotina en cualquiera de los extremos 3' o 5' y conjugarse a moléculas marcadas con estreptavidina.

Los enlazadores oligonucleotídicos pueden sintetizarse usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas en la materia, tales como aquellas descritas en Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); y Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997). En general, la síntesis de oligonucleótidos emplea grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, los métodos para la desprotección de ácidos nucleicos y los métodos para la purificación de anticuerpos son conocidos para los expertos en la materia.

En determinados casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar los niveles de activación de uno o más de los analitos o, como alternativa, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión de uno o más de los analitos se marcan directamente con el primer miembro del par de amplificación de la señal. El miembro del par de amplificación de la señal puede acoplarse a anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar niveles de activación o segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión usando métodos de sobra conocidos en la técnica. En otros casos determinados, los anticuerpos dependientes del estado de activación o los segundos anticuerpos independientes del estado de activación se marcan indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de la señal mediante unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado a los anticuerpos dependientes del estado de activación o los segundos anticuerpos independientes del estado de activación y un segundo miembro del par de unión se conjuga al primer miembro del par de amplificación de la señal. Los miembros del par de unión (por ejemplo, biotina/estreptavidina) pueden acoplarse al miembro del par de amplificación de la señal o a los anticuerpos dependientes del estado de activación o segundos anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos de sobra conocidos en la técnica. Los ejemplos de miembros del par de amplificación de la señal incluyen, pero sin limitación, peroxidasa, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, peroxidasa de eosinófilos, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa de tiroides, desyodasa y similares. Otros ejemplos de miembros del par de amplificación de la señal incluyen haptenos protegidos por un grupo protector y enzimas inactivadas mediante enlaces tioéter a un inhibidor enzimático.

En un ejemplo de direccionamiento de proximidad, el resto facilitante es glucosa oxidasa (GO) y el primer miembro del par de amplificación de la señal es peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato, tal como glucosa, esta genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H₂O₂)). En caso de que la HRP se encuentre en proximidad direccionante a la GO, el H₂O₂ generado por la GO se dirige a y forma complejos con la HRP para formar un complejo de HRP-H₂O₂, que, en presencia del segundo miembro del par de amplificación de la señal (por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente, tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico, tal como tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida), ácido monovanílico o ácido 4-hidroxifenilacético), genera una señal amplificada. Los métodos para usar GO y HRP en un ensayo de proximidad se describen en, *por ejemplo*, Langry et al., U.S. Dept. of Energy Report No. UCRL-ID-136797 (1999). Cuando se usa biotina-tiramida como segundo miembro del par de amplificación de la señal, el complejo HRP-H₂O₂ oxida la tiramida para generar un radical tiramida reactivo que se une covalentemente a los restos nucleófilos cercanos. La tiramida activada se detecta directamente o se detecta tras la adición de un reactivo de detección de señales, tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Los ejemplos de fluoróforos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, un tinte Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, rojo Texas, isocianato de tetrarrodamina (TRITC), un flúor CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similares. El marcador de estreptavidina puede acoplarse directa o indirectamente al fluoróforo o la peroxidasa usando métodos de sobra conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de reactivos cromogénicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

En otro ejemplo de direccionamiento de proximidad, el resto facilitante es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de la señal es una molécula grande marcada con múltiples haptenos que están protegidos con grupos protectores que impiden la unión de los haptenos al compañero de unión específico (por ejemplo, ligando, anticuerpo, *etc.*). Por ejemplo, el miembro del par de amplificación de la señal puede ser una molécula de dextrano marcada con moléculas protegidas de biotina, coumarina y/o fluoresceína. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos protectores fenoxi, analino, olefin, tioéter y selenoéter. Se describen fotosensibilizantes y moléculas de hapteno protegidas adecuadas adicionales para su uso en los ensayos de proximidad de la presente invención en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.807.675. Cuando se excita con luz al fotosensibilizante, este genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). En caso de que las moléculas de hapteno se encuentren a una proximidad direccionante con el fotosensibilizante, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizante se dirige a y reacciona con los tioéteres en los grupos protectores de los haptenos para dar grupos carbonilo (cetonas o aldehídos) y ácido sulfúrico, liberando a los grupos protectores de los haptenos. Los haptenos no protegidos se hacen después disponibles para unirse específicamente al segundo miembro del par de amplificación de la señal (por ejemplo, un compañero de unión específico que pueda generar una señal detectable). Por ejemplo, cuando el hapteno es biotina, el compañero de unión específico puede ser una estreptavidina marcada con enzimas. Las enzimas ejemplares incluyen fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, HRP, *etc.* Después del lavado para retirar los reactivos no unidos, puede generarse la señal detectable añadiendo un sustrato detectable (por ejemplo, fluorescente, quimioluminiscentes, cromogénico, *etc.*) de la enzima y detectarse usando métodos e instrumentación adecuados conocidos en la técnica. Como alternativa, la señal detectable puede amplificarse usando amplificación de la señal de tiramida y la tiramida activada, detectarse directamente o detectarse tras la adición de un reactivo de detección de señales como se ha descrito anteriormente.

En otro ejemplo más de direccionamiento de proximidad, el resto facilitante es un fotosensibilizante y el primer miembro del par de amplificación de la señal es un complejo de enzima-inhibidor. La enzima y el inhibidor (por ejemplo, dextrano marcado con ácido fosfónico) se unen entre sí mediante un enlazador escindible (por ejemplo, tioéter). Cuando se excita con luz al fotosensibilizante, este genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). En caso de que el complejo enzima-inhibidor se encuentre a una proximidad de direccionamiento con el fotosensibilizante, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizante se direcciona a y reacciona con el enlazador escindible, liberando el inhibidor de la enzima, de este modo activando la enzima. Se añade un sustrato enzimático para generar una señal detectable o como alternativa, se añade un reactivo de amplificación para generar una señal amplificada.

En un ejemplo adicional de direccionamiento de proximidad, el resto facilitante es HRP, el primer miembro del par de amplificación de la señal es un hapteno protegido o un complejo enzima-inhibidor como se ha descrito anteriormente y los grupos protectores comprenden p-alcoxi fenol. La adición de fenilendiamina y H_2O_2 genera una fenileno diimina reactiva que se dirige hacia el hapteno protegido o al complejo enzima-inhibidor y reacciona con grupos protectores p-alcoxi fenol para proporcionar haptenos expuestos o una enzima reactiva. La señal amplificada se genera y detecta como se ha descrito anteriormente (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.532.138 y 5.445.944).

Un protocolo ilustrativo para llevar a cabo los ensayos de proximidad descritos en el presente documento se proporciona en el ejemplo 4 de la Publicación PCT n.º WO2009/108637.

En otra realización, la presente invención proporciona kits para llevar a cabo los ensayos de proximidad descritos anteriormente que comprenden: (a) una dilución en serie de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura retenidos sobre un soporte sólido; y (b) uno o una diversidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, una combinación de anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar niveles de activación y/o una combinación de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para métodos de uso del kit para detectar el estado de expresión y/o activación de una o una diversidad de moléculas de transducción de señales de células, tales como células tumorales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales descritos anteriormente para llevar a cabo los métodos específicos de la presente invención, tales como, por ejemplo, primeros y segundos miembros del par de amplificación de la señal, reactivos de amplificación de la señal de tiramida, sustratos para el resto facilitante, tampones de lavado, *etc.*

VIII. Producción de anticuerpos

La generación y selección de anticuerpos que aún no se encuentren disponibles comercialmente para analizar los niveles de expresión y/o activación de moléculas de transducción de señales (por ejemplo, componentes de la vía de señalización de HER2 y/o c-MET) en células, tales como células de tumores gástricos de acuerdo con la presente invención pueden lograrse de varios modos. Por ejemplo, una forma es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, antígeno) usando métodos de expresión de proteínas y purificación conocidos en la técnica, mientras que otra forma es sintetizar el polipéptido de interés usando métodos de síntesis peptídica en fase sólida conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol. 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol. 289 (1997); Kiso

et al., Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99 (1990); Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60, (1995); y Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull., 44:1326-31 (1996). Después, puede inyectarse el polipéptido purificado o sintetizado, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Un experto en la materia reconocerá que hay disponibles muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Un experto en la materia también apreciará que pueden producirse fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan (por ejemplo, mantienen las regiones de unión funcionales de) anticuerpos a partir de información genética mediante diversos procedimientos. Véanse, por ejemplo, Antibody Engineering: A Practical Approach, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); y Huse et al., J. Immunol., 149:3914-3920 (1992).

Además, numerosas publicaciones han comunicado el uso de tecnología de presentación en fagos para producir y explorar bibliotecas de polipéptidos respecto de la unión a un antígeno diana seleccionado (véase, por ejemplo, Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378-6382 (1990); Devlin et al., Science, 249:404-406 (1990); Scott et al., Science, 249:386-388 (1990); y Ladner et al., la patente de los Estados Unidos n.º 5.571.698). Un concepto básico de los métodos de presentación en fagos es el establecimiento de una asociación física entre un polipéptido codificado por el ADN de fago y un antígeno diana. Esta asociación física se proporciona por la partícula de fago, que muestra un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre polipéptidos y su material genético permite la exploración en masa simultánea de grandes números de fagos que portan diferentes polipéptidos. La presentación en fagos de un polipéptido con afinidad por un antígeno diana se une al antígeno diana y estos fagos se enriquecen mediante exploración de afinidad por el antígeno diana. Puede determinarse la identidad de los polipéptidos mostrados por estos fagos a partir de sus respectivos genomas. Usando estos métodos, puede sintetizarse en masa un polipéptido identificado como poseedor de afinidad de unión por un antígeno diana deseado por medios convencionales (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.057.098).

Los anticuerpos que se generan por estos métodos pueden seleccionarse después, en primer lugar, explorando respecto de su afinidad y especificidad con el antígeno polipeptídico purificado de interés y, si es necesario, comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con otros antígenos polipeptídicos que se desee excluir de la unión. El procedimiento de exploración puede implicar la inmovilización de los antígenos polipeptídicos purificados en pocillos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo o grupo de anticuerpos potenciales se coloca posteriormente en los pocillos de microtitulación respectivos y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas. Después, se lavan los pocillos de microtitulación y se añade a los pocillos un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina en caso de que los anticuerpos generados sean anticuerpos de ratón) y se incuban durante aproximadamente 30 minutos y después se lavan. Se añade sustrato a los pocillos y se producirá una reacción de color en los sitios donde esté presente el anticuerpo para el antígeno polipeptídico inmovilizado.

Los anticuerpos identificados de este modo pueden analizarse adicionalmente respecto de su afinidad y especificidad. Al desarrollar inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como patrón con el que juzgar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se han seleccionado. Debido a que puede diferir la afinidad de unión de diversos anticuerpos, por ejemplo, algunas combinaciones de anticuerpos pueden interferir estéricamente entre sí, el rendimiento de ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad y especificidad absolutas de ese anticuerpo.

Los expertos en la materia reconocerán que pueden adoptarse diversas estrategias para producir anticuerpos o fragmentos de unión y para explorar y seleccionar por afinidad y especificidad respecto de los diversos polipéptidos de interés, pero estas estrategias no cambian el alcance de la presente invención.

50 **A. Anticuerpos policlonales**

Los anticuerpos policlonales se generan preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido de interés y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el polipéptido de interés a un transportador de proteína que sea inmunogénico en la especie que se vaya a inmunizar, tal como, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de la soja usando un agente bifuncional o derivatizante. Los ejemplos no limitantes de agentes bifuncionales o derivatizantes incluyen éster de sulfosuccinimida de maleimidobenzóilo (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (conjugación a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 y $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R_1 son diferentes grupos alquilo.

Los animales se inmunizan contra el polipéptido de interés o un conjugado o derivado inmunogénico del mismo combinando, por ejemplo, 100 μg (para conejos) o 5 μg (para ratones) del antígeno o conjugado con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, se refuerza a los animales con aproximadamente 1/5 a 1/10 de la cantidad original de polipéptido o conjugado en adyuvante incompleto de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días después, se extrae sangre de los animales y se ensaya el suero respecto de su título de anticuerpos. Normalmente

se refuerza a los animales hasta que se alcanza un título máximo. Preferentemente, se refuerza al animal con el conjugado del mismo polipéptido, pero puede usarse conjugación a una proteína inmunogénica diferente y/o a través de un reactivo reticulante diferente. También pueden producirse conjugados en cultivo celular recombinante en forma de proteínas de fusión. En determinados casos, pueden usarse agentes aglomerantes, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunitaria.

B. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen generalmente a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Por lo tanto, el modificador "monoclonal" indica la característica de que el anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975) o mediante cualquier método de ADN recombinante conocido e la técnica (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567).

En el método de hibridoma, se inmuniza a un ratón u otro animal hospedador adecuado (por ejemplo, hámster) como se ha descrito anteriormente para generar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de interés usado para la inmunización. Como alternativa, se inmuniza a los linfocitos *in vitro*. Después, se fusionan los linfocitos inmunizados con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar células de hibridoma (véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, págs. 59-103 (1986)). Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), el medio de cultivo para las células de hibridoma incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que impide el crecimiento de células deficientes para HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan la producción estable a alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y/o son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Los ejemplos de dichas líneas celulares de mieloma preferidas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos incluyen, pero sin limitación, líneas de mieloma murinas, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 (disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), células SP-2 o X63-Ag8-653 (disponibles de la American Type Culture Collection; Rockville, MD) y líneas celulares de mieloma humano o de heteromieloma de ratón-humano (véase, por ejemplo, Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, págs. 51-63 (1987)).

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

Después de identificar células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, págs. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, el fluido de ascitis o el suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede introducirse en vectores de expresión, que después se transfecta en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen anticuerpo, para inducir la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Véanse, por ejemplo, Skerra et al., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993); y Pluckthun, *Immunol Rev.*, 130:151-188 (1992). También puede modificarse el ADN, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humana en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)) o uniendo covalentemente la secuencia codificante de inmunoglobulina a la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no de

inmunoglobulina.

En una realización adicional, pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de fagotecas de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554 (1990); Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991). La producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante intercambio de cadenas se describe en Marks et al., *BioTechnology*, 10:779-783 (1992). El uso de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes se describe en Waterhouse et al., *Nuc. Acids Res.*, 21:2265-2266 (1993). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a los métodos de hibridoma de anticuerpos monoclonales para la generación de anticuerpos monoclonales.

C. Anticuerpos humanizados

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos se conocen en la técnica. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "donante". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente sustituyendo las secuencias de región hipervariable de un anticuerpo no humano por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véanse, por ejemplo, Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); y Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988). Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de región marco conservada (FR) están sustituidos por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

La selección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para su uso en la producción de los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento es una consideración importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método llamado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se reconoce frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta como la FR humana para el anticuerpo humanizado (véase, por ejemplo, Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); y Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro método usa una FR particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede usarse la misma FR para diferentes anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); y Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es importante también que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr esta meta, los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles de manera común y son familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, *es decir*, el análisis de los restos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, los restos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas de tal forma que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o los antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y específicamente implicados en influenciar la unión al antígeno.

Se contemplan varias formas de anticuerpos humanizados de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgA, IgG o IgM intacto.

D. Anticuerpos humanos

Como alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. En algunas realizaciones, pueden producirse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras su inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada de anticuerpo (JH) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7:33 (1993); y las Patentes de los Estados Unidos

n.º 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa, puede usarse tecnología de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al., Nature, 348:552-553 (1990)) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, usando repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes humanizados. Según esta técnica, se clonan los genes de dominio V de anticuerpo en fase dentro de un gen de proteína de la envuelta mayor o menor de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 o fd y presentarse como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra estas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos puede llevarse a cabo en una diversidad de formatos, tal como se describe en, *por ejemplo*, Johnson et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de gen V para la presentación en fagos. Véanse, *por ejemplo*, Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas en Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Griffith et al., EMBO J., 12:725-734 (1993); y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.565.332 y 5.573.905.

En determinados casos, pueden generarse anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro* como se describe en, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275.

E. Fragmentos de anticuerpos

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Meth., 24:107-117 (1992); y Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, hoy en día esos fragmentos pueden producirse directamente usando células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de bibliotecas de fagos discutidas anteriormente. Como alternativa, pueden recuperarse fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Carter et al., BioTechnology, 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos de F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de cultivos de células hospedadoras recombinantes. Serán evidentes otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse, *por ejemplo*, la Publicación PCT n.º WO 93/16185; y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal, tal como se describe, *por ejemplo*, en la patente de los Estados Unidos n.º 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

F. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes del mismo polipéptido de interés. Otros anticuerpos biespecíficos pueden combinar un sitio de unión para el polipéptido de interés con sitio(s) de unión para uno o más antígenos adicionales. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (véase, por ejemplo, Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) reproducen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se efectúa normalmente mediante cromatografía de afinidad. Se divulgan procedimientos similares en la Publicación PCT n.º WO 93/08829 y en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se fusionan para secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener presente la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan a un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad para ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usados en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas

de polipéptido en proporciones iguales da como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no son particularmente significativas.

5 En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada híbrida de inmunoglobulina con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena ligera híbrida de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Véanse, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO
10 94/04690 y Suresh et al., Meth. Enzymol., 121:210 (1986).

15 Según otra estrategia descrita en la patente de los Estados Unidos n.º 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de un tamaño similar o idéntico al de las cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

20 Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes y las técnicas de reticulación adecuadas se conocen bien en la técnica y se divulgan en, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 4.676.980.

25 Las técnicas adecuadas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se conocen en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. En determinados casos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos mediante un procedimiento en el cual se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Estos fragmentos se reducen en presencia del agente formador de complejos de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten a derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte al Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

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

35 También se han descrito varias técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Véanse, por ejemplo, Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" se describe por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) por medio de un enlazante que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza a que los dominios VH y VL de un fragmento se emparejen con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv) se describe en Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

40 También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Véanse, por ejemplo, Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991).

G. Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos pueden producirse dentro de una célula hospedadora aislada, en el espacio periplásmico de una célula hospedadora o secretarse directamente por una célula hospedadora al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, se retiran en primer lugar los restos celulares, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *BioTech.*, 10:163-167 (1992) describe un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los desechos celulares pueden retirarse mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta al medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran usando un filtro de concentración de proteínas comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasas, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse anticuerpos para prevenir el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que están basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (véase, por ejemplo, Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.*, 62:1-13 (1983)). La proteína G está recomendada para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (véase, por ejemplo, Guss et al., *EMBO J.*, 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es con frecuencia agarosa, pero hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permite caudales más rápidos y tiempos de procesado más cortos de los que pueden lograrse con agarosa. En los casos donde el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación por etanol, HPLC en fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de SDS-PAGE y precipitación de sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

Después de una etapa (o etapas) de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba a bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, efectuada preferentemente a bajas concentraciones de sal (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

Un experto en la materia apreciará que puede usarse cualquier molécula de unión que tenga una función similar a la de un anticuerpo, por ejemplo, una molécula de unión o un compañero de unión que sea específico para uno o más analitos de interés en una muestra, en los métodos y las composiciones de la presente invención. Los ejemplos de moléculas similares a anticuerpos adecuadas incluyen, pero sin limitación, dominios de anticuerpo, anticuerpos, nanocuerpos, proteínas reactivas con antígenos de tiburón, avímeros, adnectinas, anticalinas, ligandos de afinidad, filómeros, aptámeros, affibodies, trinectinas y similares.

IX. Métodos de administración

De acuerdo con los métodos de la presente invención, los fármacos anticáncer descritos en el presente documento se administran a un sujeto mediante cualquier medio conveniente conocido en la técnica. Los métodos de la presente invención pueden usarse para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado o una combinación de fármacos anticáncer para el tratamiento de un tumor, *por ejemplo*, tumor gástrico (de estómago), en un sujeto. Los métodos de la presente invención también pueden usarse para identificar la respuesta de un tumor, *por ejemplo*, tumor gástrico (de estómago), en un sujeto al tratamiento con un fármaco anticáncer o una combinación de fármacos anticáncer. Además, los métodos de la presente invención pueden usarse para predecir la respuesta de un sujeto que tiene un tumor, *por ejemplo*, tumor gástrico (de estómago), al tratamiento con un fármaco anticáncer o una combinación de fármacos anticáncer. Un experto en la materia apreciará que los fármacos anticáncer descritos en el presente documento pueden administrarse solos o como parte de una estrategia terapéutica combinada con quimioterapia convencional, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y/o cirugía.

En determinadas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático), tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina cinasa; un agente anti-proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o suprimir el crecimiento no controlado de células aberrantes, tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, se trata al sujeto con uno o más agentes anti-señalización, agentes anti-proliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico. Los anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina cinasa, agentes antiproliferativos, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas ejemplares se han descrito con anterioridad.

En algunas realizaciones, los fármacos anticáncer descritos en el presente documento pueden co-administrarse con agentes inmunoterapéuticos convencionales que incluyen, pero sin limitación, inmunoestimulantes (por ejemplo, Bacilo Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, interferón alfa, *etc.*), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliceamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de *seudomonas*, *etc.*) y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado a ¹¹¹In, ⁹⁰Y o ¹³¹I, *etc.*).

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

Puede administrarse repetidas veces una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco anticáncer, *por ejemplo*, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más veces o puede administrarse la dosis mediante infusión continua. La dosis puede adoptar la forma de formas de dosificación sólidas, semisólidas, de polvo liofilizado o líquidas, tal como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, aglomerados, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas o similares, preferentemente, en formas de dosis unitaria adecuadas para la administración simple de dosificaciones precisas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco anticáncer calculada para producir los efectos de aparición, tolerabilidad y/o terapéuticos deseados, en asociación con un excipiente farmacéuticamente adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, pueden prepararse formas de dosificación más concentradas, a partir de las cuales pueden producirse las formas de dosificación unitarias más diluidas. Las formas de dosificación más concentradas contendrán sustancialmente más de, *por ejemplo*, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 o más veces la cantidad del fármaco anticáncer.

Los métodos para preparar dichas formas de dosificación son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación incluyen típicamente un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la permeación en tejidos, solubilizantes y similares. Los excipientes adecuados pueden ajustarse para la forma de dosificación particular y la ruta de administración mediante métodos de sobra conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *anteriormente citado*).

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos, tales como los Carbopol, *por ejemplo*, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, *etc.* Las formas de dosificación pueden incluir además agentes lubricantes, tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes suspensores; agentes conservantes, tales como hidroxibenzoatos de metilo, etilo y propilo (es decir, los parabenos); agentes para el ajuste del pH, tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas poliméricas biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para administración oral, la dosis terapéuticamente eficaz puede encontrarse en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, pulverizaciones, pastillas para chupar, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Los excipientes adecuados para administración oral incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz adopta la forma de una píldora, comprimido o cápsula y, por lo tanto, la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco anticáncer, cualquiera de los siguientes: un diluyente, tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico y similares; un disgregante, tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante, tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante, tal como un almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. También puede formularse un fármaco anticáncer en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

Las formas de dosificación líquidas pueden prepararse disolviendo o dispersando un fármaco anticáncer y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo, tal como, por ejemplo, solución

salina acuosa (por ejemplo, cloruro de sodio al 0,9% p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, *por ejemplo*, para administración oral, tópica o intravenosa. También puede formularse un fármaco anticáncer en un enema de retención.

5 Para administración tópica, la dosis terapéuticamente eficaz puede encontrarse en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, gelatinas, soluciones, suspensiones, pomadas y parches transdérmicos. Para administración por inhalación, puede suministrarse un fármaco anticáncer en forma de un polvo seco o en forma líquida a través de un nebulizador. Para administración parenteral, la dosis terapéuticamente eficaz puede encontrarse en forma de soluciones inyectables estériles y polvos empaquetados estériles. Preferentemente, las
10 soluciones inyectables se formulan a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

La dosis terapéuticamente eficaz también puede proporcionarse en forma liofilizada. Dichas formas de dosificación pueden incluir un tampón, *por ejemplo*, bicarbonato, para su reconstitución antes de la administración o puede incluirse el tampón en la forma de dosificación liofilizada para su reconstitución con, *por ejemplo*, agua. La forma de dosificación liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, *por ejemplo*, epinefrina. La forma de dosificación liofilizada puede proporcionarse en una jeringuilla, opcionalmente empaquetada en combinación con el
15 tampón para su reconstitución, de tal forma que la forma de dosificación reconstituida puede administrarse inmediatamente a un sujeto.

20 También puede controlarse a un sujeto a intervalos de tiempo periódicos para evaluar la eficacia de un régimen terapéutico concreto. Por ejemplo, pueden cambiar los estados de activación de terminadas moléculas de transducción de señales basándose en el efecto terapéutico del tratamiento con uno o más fármacos anticáncer descritos en el presente documento. Puede controlarse al sujeto para evaluar la respuesta y comprender los efectos de determinados fármacos o tratamientos en una estrategia individualizada. Además, los sujetos que responden inicialmente aun fármaco anticáncer o una combinación de fármacos anticáncer pueden volverse refractarios al fármaco o la combinación de fármacos, indicando que estos sujetos han desarrollado resistencia a fármacos adquirida. Estos sujetos pueden abandonar su tratamiento actual y prescribirse un tratamiento alternativo de acuerdo con los métodos de la presente invención.

30 En determinados aspectos, pueden usarse los métodos descritos en el presente documento conjuntamente con paneles de marcadores de expresión génica que predicen la probabilidad del pronóstico y/o recurrencia del cáncer de estómago en diversas poblaciones. Estos paneles génicos pueden ser útiles para identificar individuos que tienen pocas probabilidades de experimentar recurrencia y, así, tienen pocas probabilidades de beneficiarse de una quimioterapia adyuvante. Pueden usarse los paneles de expresión para identificar individuos que pueden evitar con seguridad la quimioterapia adyuvante, si afectar negativamente a los resultados de supervivencia libre de enfermedad y general. Los sistemas adecuados incluyen, pero sin limitación, Oncotype DX™, que es un panel de 21 genes de Genomic Health, Inc.; MammaPrint® que es un panel de 70 genes de Agendia; y un panel de 76 genes de Veridex.

40 Además, en otros aspectos determinados, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en conjunción con paneles de marcadores de expresión génica que identifican los tumores originales para cánceres de origen primario desconocido (CUP). Estos paneles génicos pueden ser útiles para identificar pacientes con cáncer metastásico que pudieran beneficiarse de la terapia consistente con aquella dada a pacientes diagnosticados inicialmente con cáncer de estómago. Los sistemas adecuados incluyen, pero sin limitación, el ensayo Avicara Cancer TYPE ID, un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el sitio primario de origen para 39 tipos de tumor; y la prueba de tejido de origen Pathwork®, que mide la expresión de más de 1600 genes sobre una micromatriz y compara una "firma" de expresión génica de un tumor contra aquellas de 15 tipos de tejido conocidos.

50 X. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen con el fin de ilustrar, pero no de limitar, la invención reivindicada.

55 Ejemplo 1. Aislamiento, estimulación y lisis de células en circulación.

Las células en circulación de un tumor sólido comprenden células que o bien han metastatizado o han micrometastatizado desde un tumor sólido e incluyen células tumorales en circulación (CTC), células madre de cáncer (CSC) y/o células que migran al tumor (por ejemplo, células progenitoras endoteliales en circulación (CEPC), células endoteliales en circulación (CEC), células mieloides pro-angiogénicas en circulación, células dendríticas en
60 circulación, etc.). Pueden obtenerse muestras de paciente que contienen células en circulación de cualquier fluido biológico accesible (por ejemplo, sangre completa, suero, plasma, fluido de lavado ductal, aspirado del pezón, linfa, orina, saliva, aspirado con aguja fina, etc.). Las células en circulación pueden aislarse de una muestra de paciente usando uno o más métodos de separación, tales como, por ejemplo, separación inmunomagnética (véase, por ejemplo, Racila et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:4589-4594 (1998); Bilkenroth et al., Int. J. Cancer, 92:577-582 (2001)), el sistema CellTracks™ de Immunicon (Huntingdon Valley, PA), separación microfluidica (véase, por ejemplo, Mohamed et al., IEEE Trans. Nanobiosci., 3:251-256 (2004); Lin et al., Resumen n.º 5147, 97th AACR
65

Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (véase, por ejemplo, Mancuso et al., Blood, 97:3658-3661 (2001)), centrifugación por gradiente de densidad (véase, por ejemplo, Baker et al., Clin. Cancer Res., 13:4865-4871 (2003)) y métodos de eliminación (véase, por ejemplo, Meye et al., Int. J. Oncol., 21:521-530 (2002)).

5 **Aislamiento manual de CTC:**

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

- 10 1) Se usan perlas magnéticas (Dynal M450; Dynal AS; Oslo, Noruega) que se habían conjugado previamente a un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM (Kordia Life Sciences; Leiden, Países Bajos). Como alternativa, pueden usarse anticuerpos policlonales o mezclas de anticuerpos monoclonales.
- 2) Justo antes de su uso, las Dynabeads recubiertas previamente se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.
- 15 3) Se añaden 25 µl de las Dynabeads recubiertas previamente a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a 2-8°C con inclinación y rotación suaves.
- 5) Se coloca el tubo en el separador magnético (imán MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se desecha el sobrenadante y las células unidas a la perla se lavan tres veces resuspendiendo en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.
- 20 7) La muestra se resuspende en 100 µl de tampón de estimulación.

Preparación de la muestra:

- 25 1) Se extrae sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contenía EDTA a 1 mg/ml. Se desechan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células epiteliales liberadas de la vena perforada.
- 2) Se diluye 1 ml de sangre completa a 1:3 con NaCl al 0,9% antes de su uso.

Preparación de control:

- 30 1) Se efectúan controles de línea celular punteando líneas celulares de cáncer humanas en células HL-60.
- 2) Se efectúan controles de línea celular punteando líneas celulares de cáncer humanas en sangre completa de donantes sanos.

Aislamiento manual de CEC y CEPC:

35 Como ejemplo no limitante, pueden aislarse CEC y CEPC viables usando la técnica de aislamiento/enriquecimiento inmunomagnético descrita en Beerepoot et al., Ann. Oncology, 15:139-145 (2004). En resumen, se incuba sangre periférica con perlas magnéticas (Dynal M450 IgG₁) que se habían conjugado previamente a un anticuerpo monoclonal anti-CD146 (Kordia Life Sciences). Este anticuerpo reconoce a todos los linajes de células endoteliales, pero no a células hematopoyéticas o células epiteliales, en la sangre periférica (George et al., J. Immunol. Meth., 139:65-75 (1991)). La selección negativa de células hematopoyéticas y epiteliales puede usarse antes de la selección positiva con perlas magnéticas conjugadas a anticuerpos adecuados (por ejemplo, perlas Dynal-CD45 para eliminar leucocitos, perlas Dynal-CD14 para eliminar monocitos, Dynal-EpCAM para eliminar células epiteliales (Invitrogen; Carlsbad, CA)). En este ejemplo, se usa únicamente selección positiva.

45 Separación inmunomagnética de CEC y CEPC - aislamiento manual seguido de un ensayo de activación:

- 1) Se usan perlas magnéticas (Dynal M450) que se habían conjugado previamente a un anticuerpo monoclonal anti-CD146 (Kordia Life Sciences).
- 2) Justo antes de su uso, las Dynabeads recubiertas previamente se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.
- 50 3) Se añaden 25 µl de Dynabeads recubiertas previamente a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a 2-8°C con inclinación y rotación suaves.
- 5) Se coloca el tubo en el separador magnético (imán MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se desecha el sobrenadante y las células unidas a la perla se lavan tres veces resuspendiendo en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.
- 55 7) La muestra se resuspende en 100 µl de tampón de estimulación.

Preparación de la muestra:

- 60 1) Se extrae sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contenía EDTA a 1 mg/ml. Se desechan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células endoteliales liberadas de la vena perforada.
- 2) Se diluye 1 ml de sangre completa a 1:3 con NaCl al 0,9% antes de su uso.

65

Preparación de control:

- 1) Se efectúan controles de línea celular punteando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en células HL-60.
- 2) Se efectúan controles de línea celular punteando células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) en sangre completa donada por individuos sanos.

Aislamiento manual de CEPC (sin CEC):

Las CEPC son un subtipo circulante de células progenitoras procedentes de médula ósea que tienen la capacidad de diferenciar entre células endoteliales maduras en respuesta a diversos factores de crecimiento angiogénicos. Pueden aislarse CEPC mediante selección con anticuerpos que reconocen el marcador de superficie CD34. CD133 es un marcador de superficie que diferencia a células progenitoras endoteliales inmaduras (EPC) o a células madre hematopoyéticas primitivas (HSC) de las CEPC. Se han descrito diversos procedimientos de aislamiento de CEPC de diferentes fuentes usando cultivo de adherencia o microperlas magnéticas. En este ejemplo, se usa un protocolo modificado a partir del descrito en Asahara et al., Science, 275:964-967 (1997).

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

- 1) Se usan perlas magnéticas (Dynal M450 CD34). Estas perlas están recubiertas de un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de superficie CD34.
- 2) Justo antes de su uso, las Dynabeads recubiertas previamente se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.
- 3) Se añaden 25 µl de Dynabeads recubiertas previamente a 1 ml de la muestra.
- 4) La mezcla se incuba durante 20 minutos a 2-8°C con inclinación y rotación suaves.
- 5) Se coloca el tubo en el separador magnético (imán MPL-1) durante 2 minutos.
- 6) Se desecha el sobrenadante y las células unidas a la perla se lavan tres veces resuspendiendo en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.
- 7) La muestra se resuspende en 100 µl de tampón de estimulación.

Preparación de la muestra:

- 1) Se extrae sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contenía EDTA a 1 mg/ml. Se desechan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células endoteliales liberadas de la vena perforada.
- 2) Se diluyen 10 ml de sangre a 1:1 con una solución salina equilibrada.
- 3) Se disponen en capa 4 ml de sangre diluida sobre 3 ml de Ficoll-Paque en tubos de 10 ml.
- 4) Los tubos se centrifugan a 400 x g durante 30-40 min a 18-20°C.
- 5) Se extrae la capa superior que contiene plasma y plaquetas usando una pipeta Pasteur estéril, dejando inalterada la capa de células mononucleares en la interfaz.
- 6) Las células mononucleares se transfieren a un tubo de centrifugación estéril usando una pipeta estéril.
- 7) Se añaden 6 ml de solución salina y se resuspenden cuidadosamente las células.
- 8) La mezcla se centrifuga a 60-100 x g durante 10 min a 18-20°C.
- 9) Se retira el sobrenadante y se resuspenden las células mononucleares de cada tubo en 1 ml de PBS.

Aislamiento celular de CTC, CEC y CEPC usando el sistema Veridex:

Veridex, LLC (Warren, NJ) ha comercializado el sistema CellSearch, que consiste en el sistema CellTracks® AutoPrep®, el kit para células epiteliales CellSearch™ y el analizador CellTracks®. El sistema CellTracks® AutoPrep® es un sistema para preparación de muestras semi-automatizado (Kagan et al., J. Clin. Ligand Assay, 25:104-110(2002)). El kit para células epiteliales CellSearch™ consiste en: ferrofluidos recubiertos con anticuerpos anti-EpCAM específicos para células epiteliales; anticuerpos conjugados a ficoeritrina para las citoqueratinas 8, 18 y 19; un anticuerpo anti-CD45 conjugado a alofocianina; colorante DAPI; y tampones para lavar, permeabilizar y resuspender las células. El protocolo usado en este ejemplo también se describe en Allard et al., Clin. Cancer Res., 10:6897-6904 (2004). Puede usarse todo el sistema Veridex para la enumeración de CTC o, retirando la muestra manualmente después del aislamiento con el sistema CellTracks® AutoPrep®, puede proporcionar un método de aislamiento antes del análisis respecto de la activación de la vía. El número de CTC puede ser informativo para el desarrollo de algoritmos.

Sistema Veridex - enriquecimiento de CTC seguido de enumeración:

- 1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de tampón, se centrifugan a 800 x g durante 10 minutos, y después se colocan en el sistema CellTracks® AutoPrep®.
- 2) Después de que el instrumento aspire el sobrenadante, el instrumento añade los ferrofluidos.
- 3) El instrumento lleva a cabo la incubación y la posterior etapa de separación magnética.
- 4) Se aspiran las células no unidas y el plasma restante.

5) Se añaden los reactivos de tinción conjuntamente con el tampón de permeabilización para la tinción de fluorescencia.

6) Después de la incubación por parte del sistema, se separan de nuevo magnéticamente las células y se resuspenden en el dispositivo de presentación de células MagNest®.

7) El dispositivo de presentación de células MagNest® se coloca entonces en el analizador CellTracks®, un microscopio de fluorescencia semiautomático de cuatro colores.

8) Se capturan imágenes que cumplen los criterios definidos por Veridex y se muestran mediante un navegador basado en la Web para una selección manual final.

9) Los resultados de la enumeración de células se expresan como el número de células por cada 7,5 ml de sangre.

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

1) Se mezclan 7,5 ml de sangre con 6 ml de tampón, se centrifugan a 800 x g durante 10 minutos, y después se colocan en el sistema CellTracks® AutoPrep®.

2) Después de que el instrumento aspire el sobrenadante, el instrumento añade los ferrofluidos.

3) El instrumento lleva a cabo la incubación y la posterior etapa de separación magnética.

4) Se aspiran las células no unidas y el plasma restante.

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

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

1) Veridex ofrece un kit para células endoteliales CellSearch™ utilizando captura con un anticuerpo anti-CD146. El kit para células endoteliales CellSearch™ se usa conjuntamente con el sistema CellTracks® AutoPrep® para la preparación de muestras de sangre y el analizador CellTracks® para contar y caracterizar CEC y CEPC de sangre completa. El protocolo es el mismo que para el kit de células epiteliales CellSearch™.

Preparación de la muestra:

1) Enumeración: Se extrae sangre periférica de sujetos humanos en el tubo conservante CellSave de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se desechan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células epiteliales o endoteliales liberadas de la vena perforada.

2) Análisis de la vía: Se extrae sangre periférica de sujetos humanos en un tubo siliconizado que contenía EDTA a 1 mg/ml. Se desechan los primeros 3-5 ml para evitar la contaminación con células epiteliales o endoteliales liberadas de la vena perforada.

Aislamiento manual de CSC:

Cada vez hay más pruebas de que los tumores contienen una pequeña población de células madre de cáncer putativas con mecanismos de auto-renovación y supervivencia únicos (véase, por ejemplo, Sells, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 51:1-28 (2004); Reya et al., Nature, 414:105-111 (2001); Dontu et al., Trends Endocrinol. Metal., 15:193-197 (2004); y Dick, Nature, 423:231-233 (2003)). Las células madre de cáncer (CSC) pueden existir en un estado quiescente durante un largo periodo de tiempo, haciéndolas resistentes a fármacos quimioterapéuticos que se dirigen a células en división. Esta población iniciadora del cáncer puede caracterizarse respecto de su activación de las vías de auto-renovación y supervivencia sometidas a terapia dirigida por su eliminación selectiva. Se han descrito procedimientos de aislamiento de CSC usando cultivo de adherencia o microperlas magnéticas. En este ejemplo, se usa un protocolo modificado a partir del descrito en Cote et al., Clin. Can. Res., 12:5615 (2006).

Aislamiento inmunomagnético de CSC - aislamiento manual seguido de un ensayo de activación:

1) Se usan perlas magnéticas (Dynal AS; Oslo, Noruega). Estas perlas están recubiertas de un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno de superficie CD34 o CD133.

2) Justo antes de su uso, las Dynabeads recubiertas previamente se lavan una vez en un volumen igual de PBS con BSA al 0,01%.

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

4) La mezcla se incuba durante 60 minutos a 2-8°C con inclinación y rotación suaves.

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

6) Se desecha el sobrenadante y las células unidas a la perla se lavan tres veces resuspendiendo en PBS con BSA al 0,01% seguido de separación magnética.

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

Preparación de la muestra:

1) Se obtienen especímenes de médula ósea de pacientes con cáncer después de obtener el consentimiento informado del paciente.

2) El proceso de los aspirados de médula ósea se lleva a cabo como se describe en Bauer et al., Clin. Can. Res., 6:3552-3559 (2000). Se enriquece la fracción de células mononucleares que contiene cualquier célula tumoral diseminada mediante centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque usando una centrifugadora Beckman GS-6 a 4000 x g durante 35 minutos y se lavó dos veces con PBS.

5

Estimulación celular y lisis de CTC aisladas:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

15 1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.
2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

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

1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.
2) Después, se estimulan las células mediante TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

25

Las CTC estimuladas se lisan usando el siguiente protocolo:

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

35

Tabla 3

Receta del tampón de lisis (10 ml)			
Reactivos	Conc. madre	Conc. final	Volumen
Triton X-100 al 10%	10	1	1,00
Tris 1 M, pH 7,5	1	0,05	0,05
NaF 1 M	1	0,05	0,05
NaCl 5 M	5	0,1	0,20
B-glicerofosfato 2M	1	0,05	0,50
Na ₃ VO ₄ 0,1M	0,1	0,001	0,10
pepstatina 1 mg/ml	1	0,10	
Mini proteasa completa			1 comprimido
EDTA 0,5M	0,5	0,005	0,10
		Total (ml)	3,00
		Agua (ml)	7,00

Estimulación celular y lisis de CEC y/o CEPC aisladas:

40 Se cree que VEGF promueve la supervivencia activando vías antiapoptóticas tanto en CEPC (Larrivee et al., J. Biol. Chem., 278:22006-22013 (2003)) y CEC maduras, que se habían desprendido de la pared del vaso (Solovey et al., Blood, 93:3824-3830 (1999)). VEGF también puede estimular la proliferación de CEPC o CEC maduras, aunque las

CEC maduras parecen tener únicamente una capacidad proliferativa limitada en comparación con las CEPC (Lin et al., J. Clin. Invest., 105:71-77 (2000)). Por estos motivos, Las CEC y/o CEPC se activan por incubación con factores de crecimiento de la familia de VEGF antes de la lisis.

5 Estimulación celular:

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

10 Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Avastin, Nexavar, Stuent y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o Ang, cada uno a 100 nM y se incubaron a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

20 1) La muestra se incuba con Avastin, Nexavar, Stuent y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

2) Después, se estimulan las células añadiendo VEGF, FGF, PDGF, PIGF y/o Ang, cada uno a 100 nM y se incubaron a 37°C durante 120 minutos.

Las células CEC y/o CEPC aisladas se lisan usando el siguiente protocolo:

25 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos expuestos en la tabla 3.

2) Después del lavado final, se resuspenden las células en 100 µl de tampón enfriado.

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

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

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

Estimulación celular y lisis de CSC aisladas:

35 Células estimuladas:

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

40 Células estimuladas con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

45 2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

50 1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores TGF-α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células CSC aisladas se lisan usando el siguiente protocolo:

55 1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos expuestos en la tabla 3.

2) Después del lavado final, se resuspenden las células en 100 µl de tampón enfriado.

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

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

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

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

65 Este ejemplo ilustra métodos para aislar, estimular y lisar células de tejido tumoral o de especímenes de biopsia. Este ejemplo también ilustra métodos para iniciar, estimular y lisar cultivos primarios de células tumorales aisladas

de tejido, biopsia o sangre completa. Se describen métodos adicionales para aislar y cultivar células tumorales de especímenes biológicos para explorar agentes quimioterapéuticos, *por ejemplo*, en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.728.541; 6.416.967; 6.887.680; 6.900.027; 6.933.129; y 7.112.415; y en las Publicaciones de Patente de Estados Unidos n.º 20040023375 y 20050202411. Los extractos celulares preparados de acuerdo con este ejemplo pueden usarse en los ensayos de detección individual o de proximidad descritos en el presente documento.

Aislamiento de células tumorales de tejidos primarios o metastásicos:

Aislamiento y cultivo de células:

- 1) Se recogen quirúrgicamente aproximadamente 5-100 mg de tejido tumoral no necrótico y no contaminado y se coloca en un frasco de 100 ml que contiene medio para cultivo celular estéril (por ejemplo, RPMI-1640 con FBS al 10% y antibióticos).
- 2) Pueden almacenarse las muestras o enviarse a temperatura ambiente en las 72 horas posteriores a la extracción.
- 3) Las muestras se enjuagan tres veces en medio de cultivo celular.
- 4) Se tritura el tejido en pequeñas piezas con un bisturí y después se disgrega en una suspensión celular haciéndolo pasar a través de una fina malla de alambre.
- 5) Como alternativa, se trata el tejido triturado con un cóctel que contiene un 0,25% de colagenasa II y un 0,001% de DNasa diluido en medio de cultivo celular aséptico que contiene antibióticos. La incubación es durante 15-20 min con agitación suave. Las enzimas se retiran después del tratamiento lavando 3 veces con medio de cultivo celular.
- 6) La concentración celular se ajusta a 10^6 /ml y se siembran las células en placas de 6 pocillos y se dejan asentar durante la noche. Al día siguiente, se tripsinizan las células y se vuelven a sembrar en placas de microtitulación para su estimulación con ligandos y/o inhibición con fármacos dirigidos.

Estimulación y lisis de células de tumores disgregados:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

- 1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.
- 2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.
- 2) Después, se estimulan las células mediante TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células estimuladas se lisan usando el siguiente protocolo:

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

Aislamiento de células tumorales de especímenes de biopsia:

Aislamiento y cultivo de células:

- 1) Se extraen biopsias de núcleo quirúrgicamente (2 núcleos para agujas del calibre 14, 3 núcleos para agujas del calibre 16 y 4 núcleos para agujas del calibre 18, con 1-2 biopsias para las biopsias asistidas por vacío) y se colocan en un vial estéril de 10 ml que contiene medio de cultivo celular como para los especímenes tumorales.
- 2) Pueden almacenarse las muestras o enviarse a temperatura ambiente en las 72 horas posteriores a la extracción.
- 3) El material celular de las biopsias de núcleo se disgrega en una suspensión celular haciéndolo pasar a través

de una fina malla de alambre.

4) Como alternativa, las biopsias pueden tratarse con un cóctel que contiene un 0,25% de colagenasa II y un 0,001% de DNasa diluido en medio de cultivo celular que contiene antibióticos. La incubación es durante 15-20 min con agitación suave. Las enzimas se retiran después del tratamiento lavando 3 veces con medio de cultivo celular.

5) La concentración celular se ajusta a 10^6 /ml y se siembran las células en placas de 6 pocillos y se dejan asentar durante la noche. Al día siguiente, se tripsinizan las células y se vuelven a sembrar en placas de microtitulación para su estimulación con ligandos y/o inhibición con fármacos dirigidos.

Estimulación y lisis de células de biopsias:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

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

Las células estimuladas se lisan usando el siguiente protocolo:

1) Se prepara tampón de lisis fresco mezclando los reactivos expuestos en la tabla 3 anterior.

2) Después del lavado final, se resuspenden las células en 100 μ l de tampón enfriado.

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

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

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

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

Cultivo celular:

1) Las células tumorales aisladas de tejido, biopsia o sangre completa como se ha descrito anteriormente se cultivan en matraces estériles pequeños (por ejemplo, T-25), placas de Petri (por ejemplo, de 10 mm) o placas (por ejemplo, placas de 24 pocillos) dependiendo del número de células tumorales aisladas.

2) La incubación se efectúa en medio de cultivo celular (por ejemplo, RMPI-1640 con FBS al 2% y antibióticos) en una incubadora humidificada al 37°C complementada con CO₂ al 5%. Con el tiempo, las células forman una monocapa sobre el fondo del vaso y comienzan a dividirse. Cuando las células se encuentran próximas a la confluencia, se tripsinizan y vuelven a sembrarse en placas de microtitulación para su estimulación con ligandos y/o inhibición con fármacos dirigidos.

Estimulación celular y lisis de cultivos primarios procedentes de células tumorales aisladas de tejido, biopsia o sangre completa:

Estimulación celular:

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

Estimulación celular con tratamiento farmacológico:

1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.

2) Después, se estimulan las células añadiendo los factores TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 5 minutos.

Estimulación celular con tratamiento farmacológico (bucle de retroalimentación):

- 1) La muestra se incuba con Herceptin, Lapatinib, Tarceva y/o análogos de rapamicina a concentraciones terapéuticamente eficaces durante 30 min a 37°C.
- 2) Después, se estimulan las células mediante TGF- α (100 nM), Hrg (100 nM) y/o IGF (100 nM) y se incuban a 37°C durante 120 minutos.

Las células estimuladas se lisan usando el siguiente protocolo:

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

Ejemplo 3. ELISA de micromatriz de detección individual con amplificación de señal de tiramida.

Este ejemplo ilustra un ELISA de micromatriz de detección individual de alto rendimiento multiplexado que tiene un intervalo dinámico superior que es adecuado para analizar los estados de activación de moléculas de transducción de señales en células en circulación escasas:

- 1) El anticuerpo de captura se imprimió sobre un portaobjetos de FAST de 16 lechos (Whatman Inc.; Florham Park, NJ) con una dilución seriada de factor 2.
- 2) Después de secar durante una noche, se bloqueó el portaobjetos con tampón de bloqueo Whatman.
- 3) Se añadieron 80 μ l de lisado celular sobre cada lecho con una dilución en serie de factor de dilución 10. El portaobjetos se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.
- 4) Después de seis lavados con TBS-Tween, se incubaron 80 μ l de anticuerpo de detección marcado con biotina (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que reconoce a c-Met fosforilado o un anticuerpo monoclonal que reconoce a c-Met independientemente del estado de activación) durante dos horas a temperatura ambiente.
- 5) Después de seis lavados, se añadió peroxidasa de rábano picante marcada con estreptavidina (SA-HRP) y se incubó durante 1 hora para permitir que la SA-HRP se una al anticuerpo de detección marcado con biotina.
- 6) Para la amplificación de la señal, se añadieron 80 μ l de biotina-tiramida a 5 μ g/ml y se hicieron reaccionar durante 15 minutos. El portaobjetos se lavó seis veces con TBS-Tween, dos veces con DMSO al 20%/TBS-Tween y una vez con TBS.
- 7) Se añadieron 80 μ l de SA-Alexa 555 y se incubaron durante 30 minutos. Después, se lavó dos veces el portaobjetos, se secó durante 5 minutos y se escaneó en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.; Waltham, MA).

Ejemplo 4. ELISA de micromatriz de detección dual de proximidad con amplificación de señal de tiramida.

Este ejemplo ilustra un ELISA de micromatriz de detección dual de proximidad de alto rendimiento multiplexado que tiene un intervalo dinámico superior que es adecuado para analizar los estados de activación de moléculas de transducción de señales en células en circulación escasas:

- 1) El anticuerpo de captura se imprimió sobre un portaobjetos de FAST de 16 lechos (Whatman Inc.) con una dilución en serie en el intervalo de 1 mg/ml a 0,004 mg/ml.
- 2) Después de secar durante una noche, se bloqueó el portaobjetos con tampón de bloqueo Whatman.
- 3) Se añadieron 80 μ l de lisado celular A431 sobre cada lecho con una dilución en serie de factor de dilución 10. El portaobjetos se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.
- 4) Después de seis lavados con TBS-Tween, se añadieron 80 μ l de anticuerpos de detección para el ensayo de proximidad diluidos en TBS-Tween/BSA al 2%/FBS al 1% a los pocillos. La incubación fue durante 2 horas a temperatura ambiente.
 - a) Como ejemplo no limitante, los anticuerpos de detección pueden comprender los siguientes: (i) un anticuerpo monoclonal anti-c-Met que está conjugado directamente a glucosa oxidasa (GO); y (ii) un anticuerpo monoclonal que reconoce a c-Met fosforilado que se conjuga directamente a peroxidasa de rábano picante (HRP).
 - b) Como alternativa, la etapa de detección puede utilizar un conjugado de biotina del anticuerpo monoclonal que reconoce a c-Met fosforilado. En estos casos, después de seis lavados, se incluye una etapa secuencial adicional de incubación con estreptavidina-HRP durante 1 hora.
 - c) Como alternativa, la etapa de detección puede utilizar un conjugado de glucosa oxidasa (GO) mediado por oligonucleótidos del anticuerpo anti-c-Met. Puede usarse el anticuerpo para c-Met fosforilado conjugado directamente o el conjugado de HRP unido a biotina-estreptavidina (SA).

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

6) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubaron durante 30 min. El portaobjetos, se secó durante 5 minutos y se escaneó en un escáner de micromatrices (Perkin-Elmer, Inc.).

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

Los métodos y las composiciones de la presente invención pueden aplicarse a la selección de fármacos para el tratamiento del cáncer. Un protocolo típico implica la generación de dos perfiles, un perfil de activación de referencia y un perfil de activación de prueba, que después se comparan para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento farmacológico concreto (véase la figura 2).

Perfil de activación de referencia

Para obtener un perfil de activación de referencia, se obtiene una muestra de sangre o de aspirado con aguja fina (FNA) de un paciente que tiene un tipo de cáncer específico (por ejemplo, cáncer gástrico) antes del tratamiento farmacológico anticáncer. Las células circulantes escasas procedentes del tumor canceroso se aíslan de la muestra de sangre o las células tumorales de la muestra de FNA usando, *por ejemplo*, técnicas de separación inmunomagnéticas, tal como se describe en más detalle en el presente documento. Las células aisladas pueden estimularse *in vitro* con uno o más factores de crecimiento. Después, se lisan las células estimuladas para producir un extracto celular. El extracto celular se aplica a una matriz abordable que contiene una dilución en serie de un panel de anticuerpos de captura específicos para moléculas de transducción de señales cuyos estados de activación puedan estar alterados en el tipo de cáncer del paciente. La detección individual o los ensayos de proximidad se llevan a cabo usando los anticuerpos de detección adecuados (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación) para determinar el estado de activación de cada molécula de transducción de señales de interés. La tabla de "Selección de vía" mostrada en la tabla 2 es particularmente útil para seleccionar qué estados de activación detectar basándose en el tipo de cáncer del paciente. Por ejemplo, un paciente puede tener un tipo de cáncer que muestre los estados de activación de la vía de EGFR expuestos anteriormente en la "vía 1" de la tabla 2. Como alternativa, otro paciente puede tener otro tipo de cáncer que muestre los estados de activación de la vía de EGFR expuestos anteriormente en la "vía 2" de la tabla 2. De este modo, se genera un perfil de activación de referencia que proporciona los estados de activación de moléculas de transducción de señales en el cáncer del paciente en ausencia de cualquier fármaco anticáncer.

Perfil de activación de prueba

Para obtener un perfil de activación de prueba, se obtiene una segunda muestra de FNA del paciente que tiene el tipo de cáncer específico (por ejemplo, cáncer gástrico) ya sea antes del tratamiento farmacológico anticáncer o después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, en cualquier momento a lo largo del tratamiento parara el cáncer). Las células circulantes escasas procedentes del tumor canceroso se aíslan de la muestra de sangre o las células tumorales de la muestra de FNA. En caso de obtener células aisladas de un paciente que no haya recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, se incuban las células aisladas con fármacos anticáncer que se dirigen a una o más de las moléculas de transducción de señales activadas determinadas a partir del perfil de activación de referencia descrito anteriormente. La tabla de "Selección de fármaco" (tabla 1) es particularmente útil para seleccionar fármacos anticáncer adecuados que ya han sido aprobados o que se encuentran en ensayos clínicos, que inhiben moléculas de transducción de señales diana activadas específicas. Por ejemplo, en caso de que, a partir del perfil de activación de referencia, se determine que EGFR está activado, las células pueden incubarse con uno o más de los fármacos listados en la columna "A" o "B" de la tabla 1. Después, las células aisladas pueden estimularse *in vitro* con uno o más factores de crecimiento. Después, se lisan las células aisladas para producir un extracto celular. El extracto celular se aplica a la matriz abordable y se llevan a cabo ensayos de proximidad para determinar el estado de activación de cada molécula de transducción de señales de interés. De este modo, se genera un perfil de activación de prueba para el paciente que proporciona los estados de activación de moléculas de transducción de señales en el cáncer del paciente en presencia de fármacos anticáncer específicos.

Selección de fármaco

Se determina que los fármacos anticáncer son adecuados o inadecuados para el tratamiento del cáncer del paciente comparando el perfil de activación de prueba con el perfil de activación de referencia. Por ejemplo, en caso de que el tratamiento farmacológico provoque que la mayoría o todas las moléculas de transducción de señales estén sustancialmente menos activadas que en ausencia de los fármacos, *por ejemplo*, un cambio de activación fuerte sin los fármacos a activación débil o muy débil con los fármacos, se determina que el tratamiento es adecuado para el cáncer del paciente. En dichos casos, o bien se inicia el tratamiento con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que no haya recibido terapia farmacológica o se continúa el tratamiento posterior con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que ya está recibiendo el fármaco. Sin embargo, en caso de que se considere que el tratamiento farmacológico es inadecuado para el tratamiento del cáncer del paciente, se seleccionan diferentes

fármacos y se usan para generar un nuevo perfil de activación de prueba, que después se compara con el perfil de activación de referencia. En dichos casos, o bien se inicia el tratamiento con un fármaco anticáncer adecuado en un paciente que no haya recibido terapia farmacológica o se cambia el tratamiento posterior a un fármaco anticáncer adecuado en un paciente que está recibiendo el fármaco inadecuado.

5 **Ejemplo 6. Método para detectar la activación de c-Met para la selección de terapia farmacológica anticáncer.**

Este ejemplo ilustra el uso de la plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada descrita en el presente documento para identificar pacientes que podrían responder a los inhibidores anti c-Met y para identificar pacientes que se beneficiarían de una combinación de inhibidores anti c-Met con otros agentes dirigidos.

15 Una gran variedad de neoplasias malignas humanas muestra estimulación, sobreexpresión o mutación de c-Met sostenida, incluyendo carcinomas de mama, hígado, pulmón, ovario, riñón y tiroides. De manera destacable, se han identificado positivamente mutaciones activantes en c-Met en pacientes con una forma hereditaria particular de cáncer renal papilar, lo que implica directamente a c-Met en la tumorigénesis humana. La señalización aberrante de la vía de señalización de c-Met debida a la desregulación del receptor c-Met o a la sobreexpresión de su ligando, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), se ha asociado con un fenotipo agresivo.

20 Una gran cantidad de pruebas acerca de que la señalización de c-Met está implicada en la progresión y diseminación de varios cánceres y una mejor comprensión de su papel en la enfermedad han generado un interés considerable en c-Met y HGF como dianas principales en el desarrollo de fármacos para el cáncer. Esto ha desembocado en el desarrollo de una serie de antagonistas de la vía de c-Met con aplicaciones clínicas potenciales. Las tres estrategias principales para el desarrollo de fármacos anticáncer selectivos para una vía han incluido el antagonismo de la interacción ligando/receptor, la inhibición de la actividad catalítica de tirosina cinasa y el bloqueo de la interacción de receptor/efector.

25 Varios antagonistas de c-Met se encuentran en investigación clínica en la actualidad. Los resultados clínicos preliminares de varios de estos agentes, incluyendo tanto anticuerpos monoclonales como inhibidores de tirosina cinasa de molécula pequeña, han sido prometedores. De forma interesante, los pacientes con amplificación de c-Met no responden a los inhibidores de tirosina cinasa. También se encuentran en investigación clínica y son prometedoras varias terapias dirigidas a múltiples dianas, en particular, respecto de la inhibición de tirosina cinasa.

30 La tirosina cinasa receptora c-Met puede sobreexpresarse en muchas neoplasias malignas y es importante en funciones biológicas y bioquímicas. La activación del receptor c-Met puede dar lugar a un crecimiento celular aumentado, invasión, angiogénesis y metástasis. Se han identificado en c-Met mutaciones de amplificación y/o activación en el dominio de tirosina cinasa, el dominio yuxtamembrana o el dominio de semaforina. Se han empleado una serie de estrategias terapéuticas para inhibir a c-Met. Varios ensayos clínicos están investigando a c-Met y su ligando, factor de crecimiento de hepatocitos, para diversas neoplasias malignas. Como tales, los métodos para elaborar perfiles de fosforilación de c-Met en el limitado número de células cancerosas halladas en la sangre completa del paciente o en la muestra de aspirado con aguja fina (FNA) proporcionan una valiosa introspectiva acerca de la patogénesis general de la enfermedad y, por lo tanto, dan lugar a una mejor selección de la terapia anticáncer.

35 La figura 3 muestra que el ligando de c-Met, HGF, estimuló la fosforilación de c-Met, pero no la fosforilación de HER2, en células de carcinoma epidermoide A431. La fosforilación de HER2 estaba ligeramente aumentada con el tratamiento con HGF.

40 La figura 4 muestra que c-Met estaba altamente fosforilado en células de cáncer de pulmón HCC827. El tratamiento con HGF aumentó la fosforilación de c-Met en aproximadamente 4 veces en estas células HCC827. La fosforilación de HER2 no se vio afectada por el tratamiento con HGF.

45 La plataforma de micromatriz de proteína multiplexada descrita en el presente documento utiliza la información de un inmunocomplejo único que requiere de la co-localización de dos anticuerpos conjugados a enzima detectora una vez que se capturan las proteínas sobre la superficie de la micromatriz. Los eventos de direccionamiento entre dos enzimas detectoras (glucosa oxidasa (GO) y peroxidasa de rábano picante (HRP)) en proximidad permite la elaboración del perfil de una tirosina cinasa receptora (RTK), tal como c-Met con una extrema sensibilidad. La especificidad analítica se ve fuertemente aumentada dada la necesidad de unión simultánea de tres anticuerpos diferentes. En particular, el ensayo de proximidad multiplexado está basado en (1) una plataforma de micromatriz de proteína multiplexada combinada con (2) un proceso de amplificación de la señal de direccionamiento de triple anticuerpo-enzima. El diseño único y novedoso se proporciona por la estrategia de triple anticuerpo-enzima que confiere una sensibilidad muy elevada a la vez que se mantiene la especificidad:

50 (1) La diana seleccionada se captura por anticuerpos específicos de diana impresos en diluciones seriadas sobre una superficie de micromatriz. Este formato requiere una co-localización de dos anticuerpos detectores adicionales enlazados con enzimas para eventos de canalización posteriores para cada proteína diana unida (figura 5).

(2) El inmunocomplejo formado por la unión de la diana inicial mediante anticuerpos de captura y la unión secundaria de anticuerpos conjugados a GO (TON de 10^5 /min) que reconocen un epítipo alternativo en las moléculas diana capturadas puede producir H_2O_2 en presencia del sustrato de GO, glucosa.

5 (3) Después, se utiliza el flujo interno específico de diana de H_2O_2 por anticuerpos específicos de fosfopéptido conjugados con HRP (TON de 10^4 /min) que se unen al péptido fosforilado sobre las dianas capturadas, amplificando de este modo las señales específicas de diana. La especificidad para la detección de dianas fosforiladas se ve aumentada en gran medida mediante procesos de inmunodetección colaborativa y
10 amplificación, dada la necesidad de unir simultáneamente los tres tipos diferentes de anticuerpos. La detección y cuantificación de tan pocos como $\sim 2-3 \times 10^4$ eventos de fosforilación se logran rutinariamente con este método, haciendo que su detección sea a nivel de "una sola" célula. En determinados casos, esta configuración de inmunoensayo colaborativo puede aplicarse además para investigar interacciones y activaciones de proteína.

15 La tabla 4 ilustra el porcentaje de pacientes con tumores primarios que tienen expresión, mutación o activación de c-Met. De forma interesante, los pacientes con amplificación de MET en el cáncer gástrico no responden a los inhibidores de c-Met.

Tabla 4

Tipo de tumor	Expresión de MET (% de pacientes)	Mutación de MET (% de pacientes)	Amplificación de MET (% de pacientes)
Cerebro	54-88	0-9	9-20
Cabeza y cuello	52-68	11-27	n/a
Mesotelioma	74-100	0	n/a
Pulmón	41-72	8-13	0
Tiroides	40-91	6-10	n/a
Mama	25-60	0	n/a
Células renales	54-87	13-100	Trisomía 7
Hepatoma	68	0-30	n/a
Colon	55-78	0	4-89
Ovárico	64	0-4	0
Gástrico	75-90	n/a	10-20
Melanoma	17-30	0	n/a

20 Se ha demostrado que c-Met interactúa con y fosforila a cinasas, tales como RON, EGFR, HER2, HER3, PI3K y SHC. c-Met puede interactuar también con otras cinasas, *por ejemplo*, p95HER2, IGF-1R, c-KIT y otras. La micromatriz de proteínas multiplexada descrita en el presente documento puede efectuarse para interrogar el estado de una o más de estas cinasas y sus vías usando el limitado número de células cancerosas halladas en la sangre
25 completa de un paciente (por ejemplo, células tumorales en circulación) o una muestra de FNA. Los resultados del ensayo permiten la determinación de la terapia anticáncer correcta para cada paciente individual.

La figura 6 ilustra una matriz abordable ejemplar de la invención para determinar el estado de expresión y/o activación de los siguientes marcadores: c-MET, HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, p95ErbB2, HER3/ErbB3, IGF-1R, RON, c-KIT, PI3K, SHC, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3. La interrogación de estas tirosina cinasas receptoras y sus vías usando el formato de micromatriz de ensayo de proximidad permite ventajosamente la predicción de la respuesta de un paciente a una terapia con inhibidor de c-Met particular. Como ejemplo no limitante, los pacientes que responden a XL-880 tendrán c-MET y VEGFR2 activados, mientras que los que no responden tendrán una combinación de RTK activadas. De manera importante, la plataforma de micromatriz de ensayo de proximidad también puede usarse para seleccionar la terapia combinada adecuada. Por ejemplo, los pacientes con c-MET, VEGFR2 y EGFR activados deberían tratarse con una combinación de Iressa + XL880, mientras que los pacientes con c-MET, VEGFR2, ErbB1, ErbB2, ErbB3 y p95ErbB2 activados deberían tratarse con Tykerb + XL880.

La plataforma mediada por proximidad multiplexada proporciona ventajosamente sensibilidad a nivel de células individuales para detectar la activación de RTK, tales como c-Met en una cantidad de muestra limitada. Como tal, pueden elaborarse perfiles de las células tumorales en circulación (CTC) y/o las muestras de mFNA obtenidas de pacientes con cáncer metastásico para proporcionar información valiosa para ajustar la terapia y conferir práctica clínica.

Ejemplo 7. Elaboración de perfiles de cáncer gástrico usando ensayos de proximidad para la selección de terapia farmacológica anticáncer.

La elaboración de perfiles de expresión/activación de cinasas y otras moléculas de vías de transducción de señales en un muestreo en serie de tejidos tumorales proporciona información valiosa acerca de cambios que se producen en células tumorales en función del tiempo y las terapias. Esta elaboración de perfiles temporales de la progresión

tumoral permite a los profesionales médicos controlar firmas de cáncer en rápida evolución en cada paciente. Este ejemplo ilustra un ensayo nuevo y robusto para detectar el nivel de expresión y el grado de fosforilación de vías de tirosina cinasas receptoras (RTK) implicadas en el cáncer gástrico y demuestra las ventajas de usar dicho sistema diagnóstico para guiar la terapia con una sensibilidad a nivel de células individuales. El ensayo se basa generalmente en muestras, tales como aspirados con aguja fina (FNA) y sangre y logra una alta sensibilidad y especificidad para interrogar la cantidad limitada de células cancerosas obtenidas de dichas muestras.

Este ejemplo pretende además evaluar la incidencia y los rasgos clínicos del cáncer p95Her2(+): (1) investigando la frecuencia de p95Her2 en el cáncer gástrico; (2) analizando las correlaciones entre variables clinicopatológicas y p95Her2 en el cáncer gástrico; (3) correlacionando con datos preclínicos de cáncer gástrico p95Her2(+) resistente al Herceptin *in vitro*; y (4) implementando un ensayo clínico en un tratamiento a base de lapatinib en pacientes con cáncer gástrico p95Her2(+).

El cáncer gástrico es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo, con una incidencia de 18,9/100.000 cada año. Se ha estimado la incidencia del cáncer gástrico en 934.000 casos, produciéndose un 56% de los nuevos casos en Asia oriental. El cáncer gástrico supone el 20,8% de todos los cánceres en Corea según los datos del Registro Central de Tumores para el año 2002. Aunque la gastrectomía es el único tratamiento curativo para los pacientes de cáncer gástrico, una alta tasa de recurrencia del 40-60% después de la cirugía curativa sigue siendo la responsable de la escasa supervivencia general. Uno de los estudios clave en ensayos adyuvantes fue el estudio U.S. Intergoup, IN T-0116, que comunicó una supervivencia significativamente mejor con la terapia de quimiorradiación con 5-fluorouracilo (5-FU)/leucovorina y ⁴⁵Gy de radiación, en su mayor parte en pacientes con cáncer gástrico con resección nodal de D0-D1. Además, se demostró recientemente un beneficio de supervivencia potencial a causa de la terapia adyuvante de quimiorradiación (INT-0116) en pacientes con resección de D2.

Para mejorar adicionalmente la supervivencia, existe una urgente necesidad de identificar marcadores pronósticos moleculares fiables de supervivencia o recurrencia después de la terapia adyuvante de quimiorradiación, que evolucionará hacia el desarrollo de estrategias de tratamiento a medida del paciente. Además, en última instancia, la mejora de la terapia para el cáncer gástrico dependerá de nuevas estrategias terapéuticas.

Las RTK son una familia de 56 proteínas, caracterizadas por un dominio transmembrana y un motivo de tirosina cinasa. Estas funcionan en señalización celular y transmiten señales que regulan el crecimiento, diferenciación, adhesión, migración y apoptosis. La activación y/o sobreexpresión mutacional de RTK transforma las células y a menudo desempeña un papel crucial en el desarrollo de cánceres. Por dichos motivos, Las RTK se han convertido en dianas de varios agentes dirigidos molecularmente, tales como trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib, etc. La mediana de los niveles de expresión génica relativa de las 56 RTK conocidas en el cáncer gástrico indica que varias RTK, incluyendo EGFR, FGFR y subtipos de VEGFR, están presentes en el cáncer gástrico.

Recientemente, un análisis provisional del ensayo clínico ToGA, que comparó capecitabina + cisplatino (XP) frente a XP + trastuzumab en cáncer gástrico HER2(+) demostró una prolongación significativa en la tasa de supervivencia libre de progresión en la rama de trastuzumab. Curiosamente, uno de los mecanismos de resistencia al trastuzumab es la acumulación de formas truncadas del receptor HER2, p95HER2, que carecen del dominio de unión a trastuzumab extracelular. Un estudio reciente demostró que los tumores de mama que expresan p95HER2 son resistentes al trastuzumab y pueden necesitar estrategias de direccionamiento anti-HER2 alternativas o adicionales, tales como terapia combinada con trastuzumab y lapatinib. Por lo tanto, es importante determinar la frecuencia de la expresión de p95HER2 para asentar las bases de futuros ensayos clínicos que incorporen agentes dirigidos a HER2 en el cáncer gástrico.

La plataforma de micromatriz de proteína multiplexada descrita en el presente documento puede usarse para interrogar la expresión/activación de cinasas y otras moléculas de vías de transducción de señales asociadas con el cáncer gástrico. Como tal, los métodos para elaborar perfiles de marcadores de cáncer gástrico en el limitado número de células cancerosas halladas en la sangre completa del paciente o en la muestra de aspirado con aguja fina (FNA) proporcionan una valiosa introspectiva acerca de la patogénesis general de la enfermedad y, por lo tanto, dan lugar a una mejor selección de la terapia anticáncer.

Pueden obtenerse muestras de sangre completa de pacientes con cáncer gástrico para interrogarlas acerca de la vía de RTK usando los ensayos de proximidad descritos en el presente documento. Como alternativa, pueden obtenerse muestras para el análisis de vías a partir de tejidos congelados mediante seccionamiento o llevando a cabo un procedimiento de FNA congelado. En determinados casos, el seccionamiento de tejidos es el método preferido para especímenes congelados para el posterior análisis del perfil, mientras que el procedimiento de FNA relativamente no invasivo es el método preferido para obtener muestras de pacientes (y xenoinjertos) en un ambiente clínico.

Las muestras de tejido congelado pueden recogerse mediante los siguientes métodos:

Opción n.º 1. Recogida de la sección de tejido:

1. Se mantiene una barquilla de pesar sobre hielo seco, en la que se producirá el corte de la muestra.
- 5 a. Para enfriar los materiales, se mantienen las cuchillas de afeitar o las cuchillas del micrótopo, las pinzas finas y los viales de recogida de muestras pre-marcados sobre hielo seco.
2. Se toman los tejidos de cáncer humano congelados de un congelador a -80°C y se transfieren las muestras inmediatamente a hielo seco.
- 10 3. Se coloca el tejido congelado sobre la barquilla de pesar sobre hielo seco, se cortan pequeños trozos de tejido congelado (sección de 10 µm x 3) usando una cuchilla de afeitar o una cuchilla de micrótopo y se transfiere el tejido a un vial para recogida de muestras previamente enfriado y previamente marcado usando pinzas pre-enfriadas.
4. Se cierra el tapón y se mantiene sobre hielo seco.
- 15 5. En primer lugar se colocan los especímenes recogidos en una doble bolsa de plástico y después en un recipiente Styrofoam (contenedor primario) con una cantidad adecuada de hielo seco.
 - a. Se usan al menos 2,7-3,7 kg de hielo seco. En los meses de verano se usa más cantidad. NOTA: Se determinará la cantidad exacta de hielo seco tras consultar con una compañía de envíos.
 - 20 b. Se consultará con la compañía de envíos acerca del proceso de envío internacional para obtener los permisos y documentaciones necesarios.
 - c. No usar hielo húmedo o refrigerantes (es decir, acumuladores de frío).
6. Asegurarse de que se coloque en la caja la lista de pedido y de muestra, pero en la parte exterior de la bolsa doble.
- 25 7. Se sella con seguridad el contenedor y se marca con "Tejido congelado - No descongelar".

Opción n.º 2. FNA prep a partir de tejidos congelados:

- 30 1. Se toman los tejidos de cáncer humano congelados de un congelador a -80°C y se transfieren los viales de muestra inmediatamente sobre hielo seco.
2. Las muestras listas para el procedimiento de FNA deben colocarse sobre hielo mojado durante 10 minutos para ablandar el tejido.
- 35 3. La recogida de muestra de FNA debe llevarse a cabo haciendo pasar una aguja del calibre 23 o 25 a través del tejido congelado ablandado de 5 a 10 veces. Se devuelve la muestra restante al hielo seco.
4. Limpiar la tapa del vial de recogida de muestra de FNA con alcohol.
5. Los tejidos de FNA congelados deben recogerse mediante inyección directa en el vial de recogida que contiene 100 µl de "solución protein later" (Prometheus Laboratories; San Diego, CA). Los materiales tisulares recogidos se dispensan mezclando cuidadosamente el contenido.
- 40 6. Se sujeta firmemente el vial de recogida de FNA con una mano y se golpea rápidamente con el dedo (~15x) para asegurar una buena lisis celular (en caso de que sea posible, agitar vorticialmente durante 10 segundos).
7. En primer lugar, se colocan los especímenes recogidos en una doble bolsa de plástico y después en un recipiente Styrofoam (contenedor primario) con acumuladores de frío.
- 45 a. Se consultará con la compañía de envíos acerca del proceso de envío internacional para obtener los permisos y documentaciones necesarios.
8. Asegurarse de que se coloque en la caja la lista de pedido y de muestra, pero en la parte exterior de la bolsa doble.
- 50 9. Sellar con seguridad el recipiente y marcarlo con "Especimen biológico".

La figura 7 ilustra una matriz abordable ejemplar de la invención para elaborar perfiles de vías de transducción de señales activadas en el cáncer gástrico basándose en el estado de expresión y/o activación de los siguientes marcadores: HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3, p95HER2/p95ErbB2, IGF-1R, c-MET, PI3K, SHC, Akt y Erk.

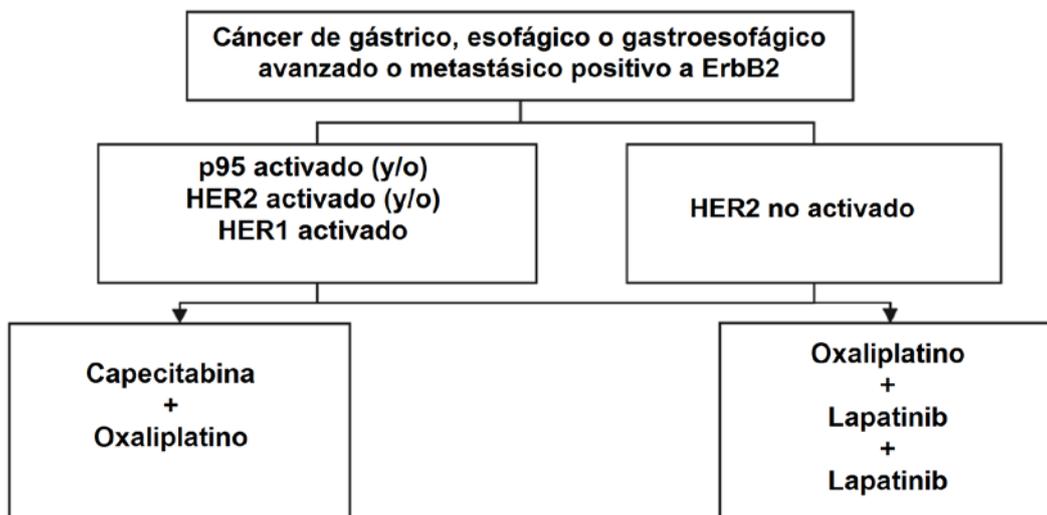
55 Este perfil de activación puede compararse con los resultados de la cohorte de 500 especímenes de cáncer gástrico para los que se están elaborando actualmente perfiles de varias dianas biológicas, incluyendo HER1, HER2, c-Met, PI3K, Akt y FGFR2. La interrogación de estas RTK y sus vías usando el formato de micromatriz de ensayo de proximidad permite ventajosamente la predicción de la respuesta a un régimen terapéutico particular para el tratamiento del cáncer gástrico. Además, el perfil de expresión/activación de RTK basado en la tecnología de

60 micromatriz de ensayo de proximidad puede ayudar en ensayos clínicos basados en agentes terapéuticos a base de RTK. Actualmente, el lapatinib se encuentra en investigación clínica en un ensayo LOGiC, donde se está evaluando su adición a un régimen de quimioterapia de capecitabina + oxaliplatino (CapeOx) respecto de su impacto para extender el tiempo hasta la progresión y la supervivencia general de pacientes con cáncer gástrico, esofágico o de la unión gastroesofágica localmente avanzado, no reseccionable o metastásico con amplificación del gen ErbB2. Como

65 tal, la elaboración de perfiles de cada enfermedad respecto de p95ErbB2, HER2 y HER1 activados además de para la expresión de HER2 proporciona información clínicamente relevante para seleccionar a los pacientes adecuados

para la terapia dirigida a HER2.

5 Como ejemplo no limitante, los pacientes con cáncer gástrico, esofágico o gastroesofágico positivo a ErbB2 avanzado o metastásico que tienen p95ErbB2 activado y/o HER2 activado y/o HER1 activado, según se determina mediante el ensayo de proximidad descrito en el presente documento deberían tratarse con una combinación de capecitabina y oxaliplatino, mientras que aquellos pacientes que tienen HER2 no activado deberían tratarse con una combinación de capecitabina, oxaliplatino y lapatinib:



10 La plataforma mediada por proximidad multiplexada proporciona ventajosamente sensibilidad a nivel de células individuales para detectar la activación de RTK y sus vías en una cantidad de muestra limitada. Como tal, pueden elaborarse perfiles de las CTC y/o las muestras de mFNA obtenidas de pacientes con cáncer gástrico para proporcionar información valiosa para ajustar la terapia y conferir práctica clínica.

15 **Ejemplo 8. Selección de pacientes para tratamiento después de determinar el tejido de origen primario mediante un panel de expresión génica.**

20 Aproximadamente un 3% a un 5% de todos los tumores metastásicos se clasifican dentro de la categoría de cáncer de origen primario desconocido (CUP). El diagnóstico correcto del tejido de origen es importante en las decisiones de tratamiento debido a que las terapias actuales están basadas en gran medida en el sitio anatómico. Los paneles de expresión génica pueden ser útiles para identificar pacientes con cáncer gástrico metastásico que pudieran beneficiarse de la terapia consistente con la administrada a pacientes diagnosticados inicialmente de cáncer gástrico. Los sistemas adecuados incluyen, pero sin limitación, el ensayo CUP de Rosetta Genomics, que clasifica cánceres y tejidos de origen mediante el análisis de los patrones de expresión de microARN (véase, por ejemplo, la
 25 Publicación PCT n.º WO 08/117278); el ensayo CancerTYPE ID™ de Aviara DX (Carlsbad, CA), un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el sitio primario de origen para 39 tipos de tumor; y la prueba de tejido de origen Pathwork™ (Sunnyvale, CA), que mide la expresión de más de 1600 genes sobre una micromatriz y compara una "firma" de expresión génica de un tumor contra aquellas de 15 tipos de tejido conocidos.
 30 Una vez que se ha identificado que el tejido de origen del paciente es el esófago y/o el estómago, pueden usarse perfiles de activación de vías para seleccionar las terapias dirigidas adecuadas para su inclusión en la pauta de tratamiento.

35 El siguiente protocolo proporciona una realización ejemplar de la presente invención, en la que se usa elaboración de perfiles de expresión génica conjuntamente con elaboración de perfiles de estado de activación para seleccionar la terapia dirigida adecuada o la combinación de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer gástrico, esofágico o gastroesofágico:

- 40 1) Se obtienen dos o más portaobjetos de vidrio con secciones de 7 µm de espesor de un tejido retirado, ya sea quirúrgicamente o mediante biopsia con aguja fina, de un tumor metastásico del paciente. Estas células se fijan en formalina y se incluyen en parafina (FFPE). Se tiñe un portaobjetos adicional del mismo tumor con H&E.
- 2) Un patólogo revisa el portaobjetos de H&E e indica el área que se va a recoger para el ensayo CancerTYPE ID™. Los portaobjetos se envían a Aviara DX para su análisis.
- 45 3) El informe de la prueba de Aviara DX indica los 5 principales sitios con mayor probabilidad de ser los sitios de origen según se determina mediante un análisis de k-vecinos más cercanos y se obtiene una predicción. En caso de que la predicción para el paciente sea de esófago y/o estómago como tumor de origen desconocido, pueden evaluarse las células del paciente respecto de la activación de vías.

4) Se aíslan células tumorales (por ejemplo, CTC) de la sangre y se preparan para su análisis como se describe en el ejemplo 1. Como alternativa, puede usarse una biopsia de aguja fina para preparar un extracto de células tumorales como se describe en el ejemplo 2. Las preparaciones celulares se ensayan como se describe en el ejemplo 3 o en el ejemplo 4. Se evalúa el perfil de activación de un modo similar al descrito en el ejemplo 6 o el ejemplo 7. Se selecciona la terapia dirigida adecuada o la combinación de terapias dirigidas.

Ejemplo 9. Elaboración de perfiles funcionales de proteínas de vías de transducción de señales en pacientes con cáncer gástrico.

Aunque la gastrectomía es el único tratamiento curativo para los pacientes de cáncer gástrico (GCA), una alta tasa de recurrencia del 40 ~ 60% después de la cirugía curativa sigue siendo la responsable de la escasa supervivencia general. Para mejorar adicionalmente la supervivencia, existe una urgente necesidad de identificar marcadores pronósticos moleculares fiables de supervivencia o recurrencia después de la terapia adyuvante de quimiorradiación, que evolucionará hacia el desarrollo de estrategias de tratamiento a medida del paciente. La mejora de la terapia para el cáncer gástrico dependerá de nuevas estrategias terapéuticas que se dirijan a moléculas críticas para la proliferación del cáncer. Ya que las proteínas de vías de transducción funcionan en la señalización celular y transmiten señales que regulan el crecimiento, diferenciación, adhesión, migración y apoptosis, se han convertido en dianas de para diversos agentes terapéuticos. La plataforma de ensayo multiplexado descrita en el presente documento puede utilizarse para la elaboración de perfiles funcionales de estas proteínas de vías de transducción.

El inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA) es una plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada que utiliza la formación de un inmunocomplejo único que requiere la co-localización de dos anticuerpos detectores. Los anticuerpos detectores se conjugan con enzimas de direccionamiento correspondientes, glucosa oxidasa (GO) y peroxidasa de rábano picante (HRP). Una vez que las proteínas diana están unidas a los anticuerpos de captura, los sucesos de direccionamiento entre GO y HRP en proximidad posibilitan la elaboración de perfiles de las proteínas diana con una sensibilidad extrema. COPIA proporciona una especificidad analítica extremadamente elevada ya que requiere de múltiples entidades químicas en proximidad diana específica para la generación/amplificación de la señal. COPIA puede configurarse también para cada proteína diana específica para permitir la detección diferencial de dianas truncadas (es decir, p95HER2) a partir de sus homólogos normales (es decir, HER2). Se aplicó COPIA para investigar los niveles de expresión y activación de proteínas de señalización en tejidos congelados recogidos de pacientes de GCA.

Este ejemplo demuestra la prevalencia de la expresión de HER1, HER2, p95HER2, HER3, IGF1-R, c-MET, PI3K, Shc, VEGFR, panCK y de otras proteínas de vía de transducción de señales y sus niveles de activación en pacientes de GCA. La mejora de la terapia para el cáncer gástrico dependerá de nuevas estrategias terapéuticas que se dirijan a marcadores específicos identificados mediante elaboración de perfiles funcionales. Ya que el perfil de la enfermedad a menudo cambia en los cánceres recurrentes y con una presión terapéutica diferente, la información clínica obtenida analizando muestras (normalmente con una disponibilidad limitada) obtenidas de una "enfermedad en evolución/heterogénea" puede ayudar a los médicos a ajustar sus opciones de tratamiento de la enfermedad para cada paciente según el cambio de perfil "personal" del cáncer.

Ejemplo 10. Elaboración de perfiles funcionales de proteínas de vías de transducción de múltiples señales en pacientes con cáncer gástrico.

RESUMEN

Aunque la gastrectomía es el único tratamiento curativo para los pacientes de cáncer gástrico (GCA), una alta tasa de recurrencia del 40 ~ 60% después de la cirugía curativa sigue siendo la responsable de la escasa supervivencia general. Para mejorar adicionalmente la supervivencia, existe una urgente necesidad de identificar marcadores pronósticos moleculares fiables de supervivencia o recurrencia después de la terapia adyuvante de quimiorradiación, que evolucionará hacia el desarrollo de estrategias de tratamiento a medida del paciente. Por lo tanto, los presentes inventores han desarrollado una plataforma de ensayo multiplexada para la elaboración de perfiles funcionales de las proteínas de vías de transducción de señales usando una plataforma de inmuno-micromatriz multiplexada. Este ejemplo demuestra la elaboración de perfiles funcionales de HER2, HER1, HER3, PI3K, cMET e IGF1R en GCA.

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo, con una incidencia de 18,9/100.000 cada año y una mortalidad de 14,7/100.000 cada año. El cáncer gástrico metastásico sigue siendo un reto desde el punto de vista terapéutico para los oncólogos debido a su mal pronóstico. En la búsqueda de una nueva diana terapéutica para el cáncer gástrico, se ha probado la sobreexpresión de HER2 y se ha comunicado en un 6-35% de los tumores de estómago y gastroesofágicos. El trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado que se dirige selectivamente a HER2, ha demostrado un beneficio de supervivencia en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2(+). Cabe destacar que, el 70-80% de los pacientes con cáncer de mama que sobreexpresa HER2 no responden al trastuzumab debido a una resistencia primaria o adquirida. Uno de los mecanismos importantes de la resistencia al trastuzumab es la acumulación de formas truncadas de HER2 (p95-HER2) que carecen del dominio

extracelular de unión a trastuzumab. En el presente documento, los presentes inventores informan acerca de la elaboración de perfiles de expresión/activación de HER2, p95-HER2 y otras proteínas de vías con potencial transactivador para la activación de HER2 para sentar las bases para ensayos clínicos futuros que incorporen agentes dirigidos a HER2 en el cáncer gástrico.

MÉTODOS

Inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA, por sus siglas en inglés, COllaborative Proximity ImmunoAssay): Las proteínas diana presentes en lisados de tejido se unen a anticuerpos de captura específicos impresos sobre una superficie de nitrocelulosa y las proteínas no diana no unidas se retiran del portaobjetos. La interacción enzimática entre un anticuerpo detector contra un epítipo alternativo en una proteína diana capturada conjugada a glucosa oxidasa (GO) y el otro anticuerpo detector específico para un sitio fosforilado en la proteína diana u otro epítipo no solapante conjugado a HRP da como resultado la generación de señal y la consiguiente amplificación de la señal mediada por tiramida (figura 8).

Impresión del portaobjetos: Los anticuerpos de captura para cada proteína diana específica se imprimen por triplicado en diluciones seriadas. Cada portaobjetos contiene controles de línea celular para la generación de una curva patrón para cuantificar de manera precisa las muestras en cada ciclo del portaobjetos. Se ejecutan muestras de control de calidad en cada portaobjetos para asegurarse de la calidad de los datos generados a partir de cada matriz-portaobjetos.

Muestras clínicas: Los tejidos de cáncer de mama congelados inmediatamente eran de pacientes con GCA localizado, histológicamente confirmado (Samsung Medical Center). Las muestras de tejido congeladas inmediatamente se lisaron en 100 µl de tampón de lisis y se almacenaron los lisados resultantes a -80°C antes de su posterior análisis.

Enriquecimiento de p95HER2: Se retiraron los receptores HER2 de longitud completa del lisado celular usando anticuerpos marcados magnéticamente específicos para el dominio extracelular (ECD) de HER2.

RESULTADOS

Las curvas patrón de titulación de HER2 se generaron usando células BT474 y se logró una sensibilidad a nivel de células individuales tal como se muestra en la figura 9. Estos valores se usan como patrón para generar valores cuantitativos para muestras clínicas. La comparación de los perfiles diferenciales de HER2 (con capturas de HER2-ECD y HER2-ICD) de células BT474 con y sin la retirada de HER2 de longitud completa demostraron que había aproximadamente un 4,4% de p95HER2 en la línea celular de referencia BT474 con HER2 amplificado (figura 10A). La cuantificación de la expresión de proteína diana y la fosforilación estaban basadas en líneas celulares con niveles de expresión de RTK conocidos (por ejemplo, BT474, T47D, HCC827) tratadas con ligandos específicos para cada RTK (figura 10B).

Se observó una gran variedad de expresión de proteínas de vías en muestras de GCA, tal como se muestra en la figura 11. La muestra con la mayor señal para cada marcador está indicada con el color más oscuro. El COPIA-HER2 mostró una alta correlación con el estado IHC-HER2. Se observaron niveles mayores de Her1 en muestras con menor expresión de HER2. El nivel de HER3-P mostró un alto nivel de correlación con la activación de HER3-T y PI3K. El perfil de cMET también mostró una fuerte correlación con la activación de PI3K. La expresión de IGF1R en esta cohorte fue relativamente menor en la mayoría de muestras. Los niveles de p95HER2 fueron prominentes en muestras con mayor expresión de HER2; sin embargo, las evidencias de activación de p95HER2 tuvieron una distribución más amplia. La tabla 5 resume la expresión de RTK en 95 muestras de GCA.

Tabla 5

	HER2	HER1	HER3	cMET	IGF1R
H	13 (14%)	13 (14%)	24 (25%)	5 (5%)	0
M	67 (70%)	64 (67%)	45 (47%)	51 (54%)	0
L	15 (16%)	18 (19%)	26 (28%)	39 (41%)	95 (100)

"H" = Alto; "M" = Medio; "L" = Bajo.

CONCLUSIÓN

Los hallazgos descritos en este ejemplo acerca del estado de HER2 y sus formas variantes, así como de otras RTK proporcionan información crítica acerca de los mecanismos potenciales pacientes de GCA positivo a HER2 que no responden al trastuzumab debido a una resistencia primaria o adquirida. El formato COPIA y el análisis de la presente invención pueden utilizarse ventajosamente para elaborar perfiles de pacientes de GCA respecto de sus proteínas de transducción de señales para seleccionar una terapia dirigida eficaz.

Ejemplo 11. Elaboración de perfiles funcionales de proteínas de vías de transducción de señales en CTC aisladas de pacientes con cáncer gástrico.

5 Este ejemplo demuestra la elaboración de perfiles funcionales de proteínas de vías de transducción de señales, tales como HER1 y HER2 en células tumorales en circulación (CTC) obtenidas de la sangre de pacientes con cáncer gástrico (GCA) usando la plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada del inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA) descrito en el presente documento. Como tal, un objetivo particular de los experimentos expuestos en este ejemplo fue investigar la frecuencia de CTC positivas a HER2 en el GCA.

10 Pacientes y ensayo de muestras: Se reclutaron a pacientes con cáncer gástrico en estadio III o IV (N = 100) en el estudio y se llevó a cabo una sola recogida de muestras de sangre. En algunos casos, se obtuvo una muestra de ascitis.

15 Mediciones de resultado: Expresión y activación de HER1 y HER2 en CTC aisladas de muestras de sangre de pacientes con GCA.

Reclutamiento y estado:

tipo de muestra	n.º esperado	Reclutamiento
Sangre	100	83 (80)
Ascitis	no definido	3
3 pacientes de GCA tuvieron un volumen de sangre insuficiente para el análisis COPIA.		

20 La figura 12 muestra el número de CTC obtenidas de 7,5 ml de sangre en 82 muestras de pacientes de GCA, según se determinó mediante el sistema de enumeración de CTC Veridex. En particular, 39 de 82 (48%) de las muestras de sangre de GCA fueron positivas para CTC, mientras que 12 de 82 (14,6%) de las muestras de sangre de GCA fueron positivas para HER2.

25 La figura 13 muestra la expresión y la activación de HER1/EGFR y de HER2 en CTC aislados de pacientes de GCA determinado mediante COPIA. Las muestras con CTC identificadas mediante el sistema Veridex mostraron una expresión prominente de HER1 y HER2, con menores niveles de activación de HER1 y HER2 (es decir, fosforilación).

30 El formato COPIA y el análisis de la presente invención pueden utilizarse ventajosamente para elaborar perfiles de pacientes de GCA respecto de sus proteínas de transducción de señales para seleccionar una terapia dirigida eficaz. Por ejemplo, la determinación de la expresión y activación de HER1 y HER2 en pacientes con GCA proporciona una introspectiva acerca de si la terapia dirigida a una o ambas de estas RTK sería eficaz.

35 **Ejemplo 12. Elaboración de perfiles funcionales de proteínas de vías de transducción de señales en tejido tumoral aislado de pacientes con cáncer gástrico.**

40 Este ejemplo demuestra la elaboración de perfiles funcionales de proteínas de vías de transducción de señales, tales como HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc en muestras de tejido tumoral de cáncer gástrico (GCA) usando la plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada del inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA) descrito en el presente documento. Este ejemplo también demuestra la elaboración de perfiles funcionales de p95HER2 en muestras de tejido de tumor de GCA usando COPIA. Como tales, los objetivos particulares de los experimentos expuestos en este ejemplo fueron (1) investigar la frecuencia de p95HER2 en tejido tumoral de GCA, (2) analizar la correlación entre variables clinicopatológicas y p95HER2 y (3) correlacionar con datos preclínicos de cáncer gástrico p95HER2(+) resistente a trastuzumab *in vitro*.

45 Pacientes y ensayo de muestras: En este estudio se usaron 447 especímenes de tejido tumoral de GCA congelados obtenidos de resecciones quirúrgicas.

50 Mediciones de resultado: Expresión y activación de proteínas de vías de transducción de señales, incluyendo p95HER2, en GCA.

Reclutamiento: Se recogieron 447 muestras de tejido de GCA congeladas y se ensayaron 10 marcadores.

55 La figura 14 muestra el grado de correlación entre inmunohistoquímica (IHC) y COPIA para detectar la expresión de HER2 en tejido tumoral de GCA. En particular, La figura 14 muestra que hubo un alto grado de correlación entre IHC y COPIA en la categoría "IHC 3", que corresponde a muestras de tejido de GCA que tienen el nivel máximo de expresión de HER2 determinada mediante IHC. Sin embargo, un número significativo de muestras de tejido de GCA identificadas como "IHC 0" (que corresponde a expresión de HER2 no detectable por IHC) tuvieron de hecho niveles de moderados a altos de expresión de HER2, según se determinó mediante COPIA. Como tal, la figura 14 ilustra la

sensibilidad dramáticamente aumentada que se consigue usando COPIA cuando se compara con análisis IHC convencional de la expresión de HER2.

Se observó una gran variedad de expresión de proteínas de vías en muestras de GCA, tal como se muestra en la figura 15. La muestra con la mayor señal para cada marcador está indicada con el color más oscuro. Los análisis ensayados mediante COPIA incluyeron las siguientes proteínas de vía de transducción de señales: HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc. Estos análisis pueden analizarse respecto tanto de niveles de expresión como de niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) usando COPIA. En determinadas realizaciones, los niveles de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más análisis adicionales que incluyen, pero sin limitación, p95HER2, Akt, p70S6K, VEGFR y/o PDGFR pueden analizarse en muestras de tejido de GCA usando COPIA.

La figura 16 muestra los análisis COPIA de los niveles de expresión de HER2, HER3, c-Met, IGF1R y cKit y los niveles de activación de PI3K en tejido tumoral de GCA a dos concentraciones de lisado tumoral diferentes. En particular, COPIA pudo detectar la expresión o los niveles de activación de cada analito interrogado a ambas concentraciones de lisado tumoral.

La figura 17 muestra el perfil de expresión de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc en muestras de tejido tumoral de GCA usando la plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada de COPIA descrito en el presente documento. Se usaron IgG y citoqueratina (CK) como controles y se ensayaron los niveles de expresión de HER1 con dos anticuerpos de captura diferentes (denominados "HER1" y "HER1-2"). Las muestras de tejido de GCA analizadas en la figura 17 tenían todas el nivel máximo de expresión de HER2 determinado mediante IHC (indicado como "IHC 3+"). En particular, la figura 17 muestra que una alta expresión de HER2 determinada mediante IHC (es decir, IHC 3+) no siempre corresponde a los niveles de expresión de HER2 medidos mediante COPIA. Sin quedar ligados a cualquier teoría particular, la discordancia observada entre IHC y COPIA se debe a la mayor sensibilidad y especificidad y al intervalo dinámico superior logrado con la plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada COPIA descrita en el presente documento. La figura 17 también ilustra que la elaboración de perfiles funcionales de múltiples componentes de vías de transducción de señales, tales como las vías de HER2 y/o c-MET proporcionan una valiosa introspectiva acerca de la selección de uno o más fármacos anticáncer adecuados para el tratamiento del cáncer gástrico.

Por ejemplo, la figura 17 ilustra que el paciente 14742212 probablemente no responda a Herceptin® debido a los altos niveles de p95HER2 y HER3. Pertuzumab tampoco será eficaz para prevenir la dimerización debido al alto nivel de p95HER2. Una terapia anticáncer adecuada es el uso de uno o más inhibidores de pan-HER de molécula pequeña, tales como PF-00299804. Otra terapia anticáncer adecuada es el uso de uno o más inhibidores de c-MET en combinación con uno o más inhibidores de pan-HER, tales como neratinib. La figura 17 ilustra además que al paciente 12619785, con altos niveles de expresión de HER1, HER3 e IGF1R, se le debería administrar uno o más inhibidores de pan-HER de molécula pequeña, tales como PF-00299804 o uno o más inhibidores de IGF1R en combinación con uno o más inhibidores de pan-HER, tales como neratinib. La figura 17 también ilustra que el paciente 14609744 probablemente no responda a Herceptin® debido a los altos niveles de HER3. Sin embargo, este paciente tiene un bajo nivel de p95HER2. Como tal, un ejemplo de una terapia anticáncer adecuada es el uso de pertuzumab u otro inhibidor de la dimerización de HER2. En determinados casos, puede combinarse pertuzumab con uno o más inhibidores de c-MET, inhibidores pan-HER y/o inhibidores de PI3K. En otros casos determinados, se usan inhibidores de PI3K en la combinación junto con inhibidores de mTOR y/o MEK. Otro ejemplo de una terapia anticáncer adecuada es el uso de uno o más inhibidores de pan-HER en combinación con uno o más inhibidores de c-MET. Además, la figura 17 muestra que Herceptin® probablemente no sea una terapia eficaz debido a la coexpresión de otras RTK en los pacientes 15530461 y 13313978. Pertuzumab probablemente tampoco será eficaz ya que el nivel de p95HER2 es elevado. Una terapia anticáncer adecuada es el uso de uno o más inhibidores de pan-HER en combinación con uno o más inhibidores de c-MET.

Las figuras 18 y 19 muestran el perfil de expresión de HER1, HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K y Shc en muestras adicionales de tejido tumoral de GCA usando COPIA. Se usaron IgG y citoqueratina (CK) como controles y se ensayaron los niveles de expresión de HER1 con dos anticuerpos de captura diferentes (denominados "HER1" y "HER1-2"). Las muestras de tejido de GCA analizadas en las figuras 18 y 19 tuvieron diversos niveles de expresión de HER2 determinados mediante IHC. En particular, estas figuras muestran que el nivel de expresión de HER2 determinado mediante IHC no siempre se correlaciona con el nivel de expresión de HER2 medido mediante COPIA. Sin quedar ligados a cualquier teoría particular, la discordancia observada entre IHC y COPIA se debe a la mayor sensibilidad y especificidad y al intervalo dinámico superior logrado con la plataforma de micromatriz de proteínas multiplexada COPIA descrita en el presente documento. Además, estas figuras ilustran que la elaboración de perfiles funcionales de múltiples componentes de vías de transducción de señales, tales como las vías de HER2 y/o c-MET proporcionan una valiosa introspectiva acerca de la selección de uno o más fármacos anticáncer adecuados para el tratamiento del cáncer gástrico.

Por ejemplo, la figura 18 muestra que Herceptin® puede ser eficaz en el paciente 15199037 ya que el nivel de p95HER2 es bajo. Sin embargo, hay probabilidad de que este paciente pueda desarrollar resistencia al Herceptin® debido a la expresión de HER3 y c-MET. Como tal, un ejemplo de una terapia anticáncer adecuada es usar o

cambiar a uno o más inhibidores de pan-HER de molécula pequeña, tales como PF-00299804 y/o pertuzumab en combinación con uno o más inhibidores de c-MET. La figura 18 también muestra que el paciente 15286982 tiene un bajo nivel de HER2, pero un alto nivel de HER3. Este paciente puede beneficiarse de la administración de uno o más inhibidores de pan-HER y/o de pertuzumab cuando se combina con uno o más inhibidores de c-MET y uno o más agentes quimioterapéuticos. La figura 18 ilustra además que al paciente 13777507, sin expresión detectable de HER2, se le puede administrar uno o más inhibidores de c-MET en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos.

La figura 19 muestra que deberían seleccionarse uno o más agentes quimioterapéuticos para el paciente 13758944 debido a los bajos niveles de HER1, HER2, HER3 y c-MET y a los niveles indetectables de p95HER2. La figura 19 también muestra que el paciente 13725795 puede beneficiarse de la terapia con uno o más inhibidores de pan-HER y/o pertuzumab en combinación con uno o más inhibidores de c-MET y uno o más agentes quimioterapéuticos. Además, La figura 19 ilustra que al paciente 13690624, con altos niveles de HER1, HER2, HER3 e IGF1Ras determinados mediante COPIA, se le puede administrar uno o más inhibidores de pan-HER y/o pertuzumab con uno o más inhibidores de IGF1R. La figura 19 también muestra que deberían seleccionarse uno o más inhibidores de c-MET para el paciente 14622912 debido a los niveles indetectables de HER2, p95HER2 y HER3 y la presencia de expresión de c-MET. La figura 19 muestra también que pueden seleccionarse pertuzumab y/o uno o más inhibidores de pan-HER, tales como PF-00299804, en combinación con uno o más inhibidores de c-MET como una terapia adecuada para el paciente 04021208. Además, la figura 19 muestra que el paciente 14691628, con expresión de c-MET e IGF1R, así como expresión de HER, puede beneficiarse del uso de uno o más inhibidores de pan-HER en combinación con uno o más inhibidores de c-MET y uno o más inhibidores de IGF1R.

La figura 20 muestra el nivel de expresión de p95HER2 en muestras de tejido tumoral de GCA determinados mediante COPIA (por ejemplo, usando el ensayo de proximidad de receptor truncado como se describe en el presente documento) en muestras en las que se determinó mediante IHC que eran IHC 3+ para la expresión de HER2. Los pacientes de GCA con niveles altos o más altos de expresión de p95HER2 tienen mayores probabilidades de no responder a las terapias dirigidas a HER2, tales como Herceptin® (por ejemplo, los pacientes de GCA mostrados en el lado izquierdo de la gráfica en la figura 20), mientras que los pacientes de GCA con niveles bajos o más bajos de expresión de p95HER2 tienen una mayor probabilidad de responder a las terapias dirigidas a HER2, tales como Herceptin® (por ejemplo, los pacientes de GCA mostrados en el lado derecho de la gráfica en la figura 20).

Las figuras 21 y 22 muestran la discordancia observada entre la IHC y COPIA respecto de la expresión de HER2. En particular, las muestras de tejido tumoral de GCA que de hecho tenían altos niveles de HER2 se puntuaron como con HER2 bajo o no detectable mediante IHC. Estas figuras también muestran el nivel de expresión de p95HER2 en las muestras de GCA discordantes para HER2 (flecha). Además, La figura 23 ilustra el amplio intervalo de niveles de expresión de p95HER2 observados mediante COPIA en muestras de tumores de GCA que se puntuaron mediante IHC con el nivel máximo de expresión HER2 (es decir, IHC 3+).

Ejemplo 13. Análisis de datos para la cuantificación de proteínas de vías de transducción de señales en células de cáncer gástrico.

Este ejemplo ilustra la cuantificación de los niveles de expresión y/o activación de uno o más analitos, tales como una o más proteínas de transducción de señales en una muestra biológica (por ejemplo, sangre o tejido tumoral) frente a una curva patrón generada para el analito de interés particular.

En algunas realizaciones, cada portaobjetos de COPIA se escanea en tres ajustes de ganancia de fotomultiplicador (PMT) para mejorar la sensibilidad y reducir el impacto de la saturación. Se usa el programa informático SanArray Express de Perkin Elmer para el hallazgo de puntos y la cuantificación de la señal. Se importan los identificadores para cada punto del archivo GenePix Array List (.gal). El número específico del estudio desidentificado para cada muestra clínica en un portaobjetos se incorpora en el conjunto de datos resultante.

En otras realizaciones, se promedian las intensidades de señal corregidas respecto del fondo para puntos duplicados impresos por triplicado. Se resta el valor de fluorescencia relativa del blanco de reactivo respecto de cada muestra. Se usan varios criterios de calidad para filtrar datos de análisis adicionales, incluyendo límites en la huella del punto, el coeficiente de variación para puntos replicados, el fondo de lecho general y la intensidad del blanco de reactivo.

Para cada ensayo, puede generarse una curva sigmoideal para múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, etc.) concentraciones de lisados celulares diluidos en serie preparados a partir de líneas celulares, tales como MD-468 (positiva a HER1), SKBr3 (positiva a HER2), BT474 (positiva a HER2 y p95HER2), HCC827 (positiva a c-MET y HER1), T47D estimulada con IGF (positiva a IGF1R) y/o T47D estimulada con HRG (positiva a HER3). Puede representarse cada curva como una función de la intensidad de señal frente a las unidades derivadas en concentración logarítmica, UC (unidad computarizada). Los datos pueden ajustarse a una ecuación de cinco parámetros (5PL) mediante regresión no lineal (Ritz, C. y Steibig, J. C., J. Statistical Software, 12, 1-22 (2005)), ajustando simultáneamente las tres diluciones del anticuerpo de captura. El ajuste se lleva a cabo usando R, un

paquete informático de código abierto (Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.R (2008)). Para evitar el exceso de parametrización del modelo matemático y de este modo mejorar la precisión, pueden restringirse cuatro parámetros, mientras que cada dilución puede resolverse para un punto de inflexión individual. Este proceso puede repetirse para cada configuración de ganancia de PMT de 45, 50 y 60. Esto da como resultado nueve curvas patrón generadas por cada ensayo, a partir de tres diluciones de anticuerpo de captura y tres escaneos de PMT. La redundancia incorporada en el ensayo posibilita la eliminación de una o más de las combinaciones dilución/escaneo en caso de que el ajuste de la curva patrón tenga un R^2 menor de 0,95 y por lo tanto mejora las posteriores predicciones.

Cálculo de UC (basado en la curva patrón) - Las predicciones individuales de cada una de las curvas patrón (por ejemplo, 3 diluciones de anticuerpo de captura y 3 escaneos con ajuste de ganancia de PMT) pueden combinarse en una sola predicción final. Para cada predicción, se calcula la pendiente del punto en la curva patrón. Esta pendiente se obtiene en unidades log en el eje x, es decir, las unidades en el denominador de la pendiente son unidades computarizadas (UC) logarítmicas. En segundo lugar, se calcula una media ponderada de las predicciones, donde se determinan las ponderaciones a partir de las pendientes. Específicamente, se suman las ponderaciones y a cada punto se le asigna una ponderación igual a su pendiente dividida entre las pendientes totales. Puede validarse cada ensayo contra predicciones para controles conocidos.

Ejemplo 14. Selección de tratamiento para cáncer gástrico usando inmunoensayo de proximidad colaborativa (COPIA).

Cáncer gástrico avanzado positivo a HER-2

En este ensayo clínico de cáncer gástrico avanzado propuesto, se evalúa la eficacia terapéutica de una combinación de un agente de direccionamiento a HER2, tal como trastuzumab combinado con un inhibidor dual de HER-1 y HER-2, tal como lapatinib, en pacientes que han fracasado un solo tratamiento de uno o del otro. El requisito de elegibilidad es que el individuo haya fracasado previamente con al menos un régimen quimioterapéutico, es decir, trastuzumab o lapatinib. El individuo tiene un adenocarcinoma del estómago o de la unión gastroesofágica confirmado histológicamente con enfermedad inoperable localmente avanzada o recurrente y/o metastásica, no susceptibles a una terapia curativa.

El individuo tiene un tumor positivo a HER2 (tumor primario o metástasis definida como i) 3+ en IHC y/o ii) FISH (+)). El tumor positivo a HER2 se confirma usando COPIA. Los investigadores planean este ensayo de terapia dual de fase II en pacientes con un cáncer gástrico avanzado positivo a HER-2 confirmado mediante COPIA después de haber fracasado con al menos un régimen quimioterapéutico.

Eficacia del tratamiento de primera línea en el cáncer gástrico

Este ensayo de fase II aleatorizado propuesto determina hasta qué punto son eficaces el clorhidrato de epirrubicina o el 5-fluorouracilo cuando se administran conjuntamente con o sin ditosilato de lapatinib como tratamiento de primera línea para tratar pacientes con cáncer gástrico.

El objetivo es determinar la actividad del tratamiento de primera línea que comprende clorhidrato de epirrubicina o 5-fluorouracilo con o sin ditosilato de lapatinib en pacientes con adenocarcinoma de estómago o de la unión gastroesofágica que es metastásico o no susceptible de cirugía curativa según el estado de HER2 y EGFR. Un objetivo adicional es explorar la actividad de este régimen en pacientes que son negativos para HER2 mediante IHC (0 y 1+) y negativos para HER-2 mediante COPIA - o \pm , así como pacientes que son positivos para HER2 mediante IHC (2+ y 3+) y positivos mediante COPIA +++ o ++++. Un objetivo es evaluar la concordancia de la determinación de HER2 mediante IHC y COPIA. Además, el estado de EGFR se evalúa también mediante IHC y COPIA.

En este estudio propuesto, se estratifica a los pacientes según la institución y la combinación del estado de HER2/EGFR determinado mediante ensayos de inmunohistoquímica (IHC) y COPIA (positivo para HER2 mediante IHC 2/3+ y positivo mediante COPIA 3/4+ y positivo para EGFR mediante IHC y positivo mediante COPIA frente a negativo para HER2 mediante IHC y negativo mediante COPIA, positivo a EGFR mediante IHC, pero negativo mediante COPIA). Se aleatoriza a los pacientes a 1 de 2 ramas de tratamiento.

Después de completar el tratamiento del estudio, se efectúa un seguimiento de los pacientes a las 8 semanas, cada 3 meses durante 2 años y posteriormente cada 6 meses.

Lapatinib frente a Lapatinib + Capecitabina en el tratamiento de cáncer gástrico que sobreexpresa HER2

La mayoría de pacientes con cáncer gástrico metastásico se someten a quimioterapia combinada de primera línea (por ejemplo, derivados de platino y fluoropirimidinas, en ocasiones combinada con un taxano), pero aún no se ha definido bien el papel de la quimioterapia de segunda línea. Por lo tanto, la progresión durante o poco después de la quimioterapia de primera línea es una afección médica donde no existe una estrategia médica convencional. La

sobreexpresión de EGFR y HER2 en el cáncer gástrico y gastroesofágico convierten a estas indicaciones en candidatos principales para el tratamiento con un inhibidor dual de tirosina cinasa ErbB1/2 (TKI), tal como lapatinib.

5 En este estudio propuesto, se mide la sobreexpresión de HER2 mediante COPIA y FISH (amplificación o número de copias génicas aumentado). La activación y expresión de EGFR se mide mediante COPIA. En una rama, se administra a los pacientes lapatinib y en la otra rama, se administra a los pacientes lapatinib con capecitabina. Se aleatoriza a los pacientes a 1 de 2 ramas de tratamiento.

10 Después de completar el tratamiento del estudio, se efectúa un seguimiento de los pacientes a las 8 semanas, cada 3 meses durante 2 años y posteriormente cada 6 meses.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar o predecir la repuesta de un cáncer gástrico al tratamiento con un fármaco anticáncer o para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer gástrico, comprendiendo el método:
- 10 (a) determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de HER1 solo o de HER1 en combinación con uno o más analitos seleccionados entre el grupo que consiste en HER2, p95HER2, HER3, c-Met, IGF1R, cKit, PI3K, Shc, Akt, p70S6K, VEGFR, PDGFR y combinaciones de los mismos en un extracto celular producido a partir de una célula de cáncer aislada; y
- (b) identificar o predecir la repuesta del cáncer gástrico o seleccionar un fármaco anticáncer adecuado basándose en el nivel de expresión y/o el nivel de activación de dichos uno o más analitos determinados en la etapa (a).
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se calibra el nivel de expresión y/o el nivel de activación de dichos uno o más analitos frente a una curva patrón generada para dichos uno o más analitos.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula cancerosa se aísla de un sujeto que tiene el cáncer gástrico después de la administración de un fármaco anticáncer.
- 25 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que se pone en contacto la célula cancerosa aislada con un fármaco anticáncer.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en el que se identifica o predice la respuesta del cáncer gástrico o se selecciona el fármaco anticáncer adecuado comparando el nivel de expresión y/o el nivel de activación de dichos uno o más analitos respecto de un perfil de expresión y/o activación de referencia de dichos uno o más analitos que se genera en ausencia del fármaco anticáncer.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer gástrico es un adenocarcinoma o en el que el cáncer gástrico ha metastatizado al esófago, el intestino delgado, los nódulos linfáticos, órganos, hueso o combinaciones de los mismos.
- 35 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dichos uno o más analitos comprenden HER2, HER3, c-Met, IGF1R, PI3K.
- 40 8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula cancerosa es una célula tumoral circulante o una célula de un aspirado con aguja fina (FNA) obtenida de un tumor, preferentemente un tumor gástrico.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula cancerosa se obtiene de una muestra, preferentemente, de una muestra obtenida de un sujeto con cáncer gástrico.
- 45 10. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula aislada se estimula *in vitro* con uno o más factores de crecimiento.
- 50 11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el fármaco anticáncer se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, inhibidor de tirosina cinasa, agente antiproliferativo, agente quimioterapéutico y combinaciones de los mismos.
- 55 12. El procedimiento de la reivindicación 1, que además comprende determinar el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más analitos adicionales en el extracto celular, en el que los uno o más analitos adicionales comprenden
- 60 (i) una o más moléculas de transducción de señales seleccionadas entre el grupo que consiste en tirosina cinasas receptoras, tirosina cinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina cinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadoras de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos; o
- (ii) una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en HER4, MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, GSK-3 β , Raf, SRC, NFkB-IkB, mTOR, Eph-a, Eph-b, Eph-c, Eph-d, Flt-3, Tie-1, Tie-2, cFMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON y combinaciones de los mismos.
- 65 13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación del nivel de expresión de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende detectar un nivel total de dichos uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para dichos uno o más analitos.

14. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación del nivel de activación de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende detectar un nivel de fosforilación de dichos uno o más analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para una forma fosforilada de dichos uno o más analitos.

5 15. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación del nivel de expresión de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende:

- 10 (i) incubar el extracto celular con una dilución en serie de anticuerpos de captura específicos para dichos uno o más analitos de una diversidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido;
- 15 (ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para dichos uno o más analitos para formar una diversidad de analitos detectables capturados, en el que los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;
- 20 (iii) incubar la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la determinación del nivel de activación de dichos uno o más analitos en la etapa (a) comprende:

- 25 (i) incubar el extracto celular con una dilución en serie de anticuerpos de captura específicos para dichos uno o más analitos de una diversidad de analitos capturados, en el que los anticuerpos de captura se retienen sobre un soporte sólido;
- 30 (ii) incubar la diversidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para dichos uno o más analitos para formar una diversidad de analitos detectables capturados, en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitante, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de la señal y el resto facilitante genera un agente oxidante que se dirige a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de la señal;
- 35 (iii) incubar la pluralidad de analitos detectables capturados con un segundo miembro del par de amplificación de la señal para generar una señal amplificada; y
- 40 (iv) detectar la señal amplificada generada a partir de los miembros primero y segundo del par de amplificación de la señal.

Rutas de la familia de ERbB

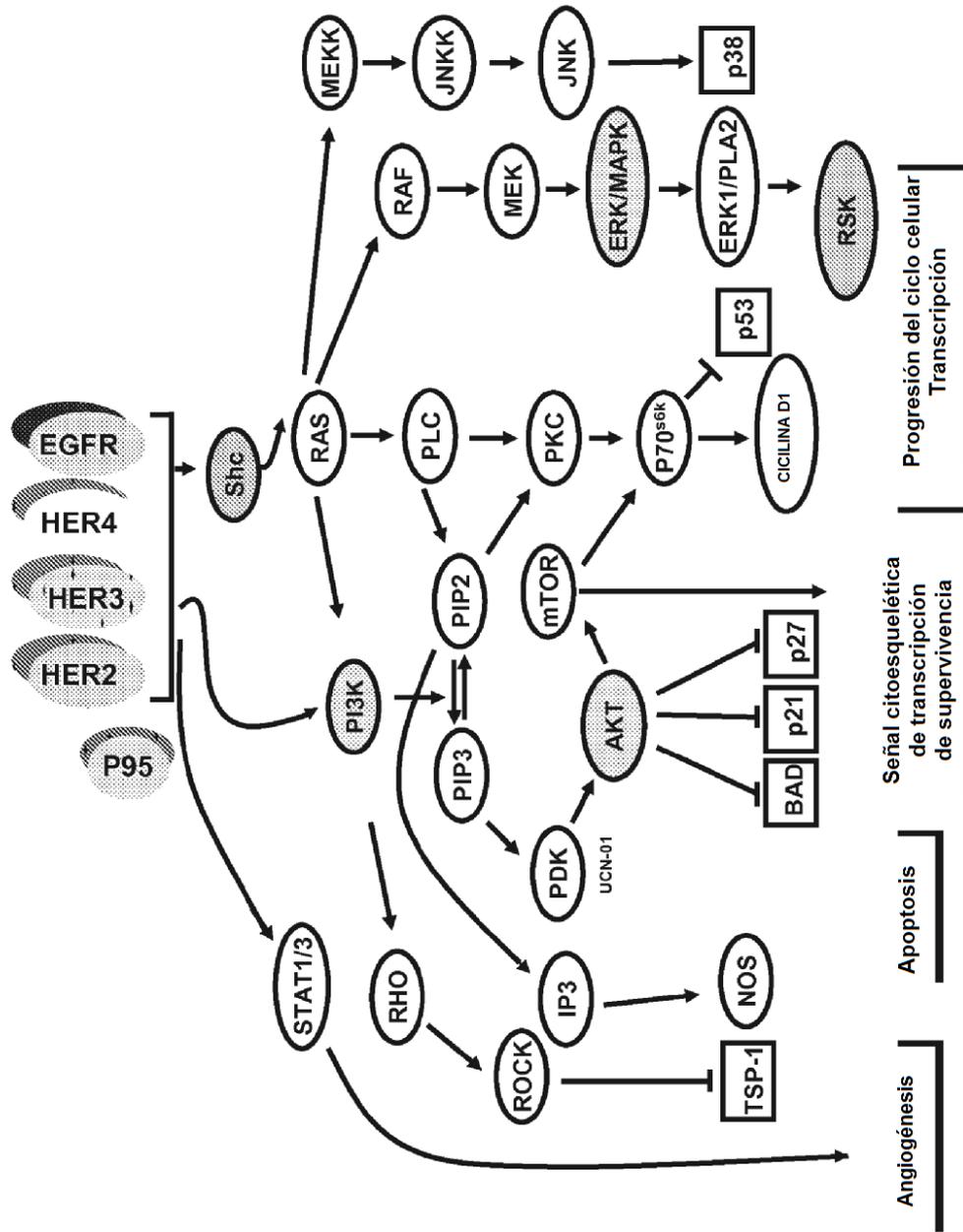


FIG. 1

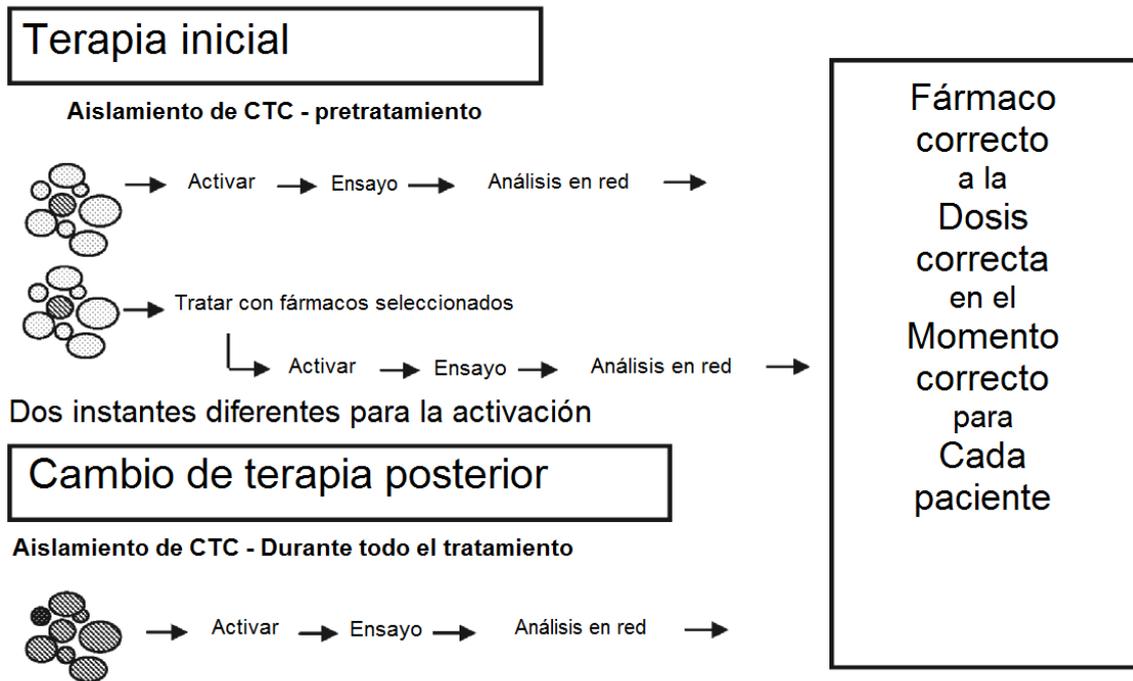


FIG. 2

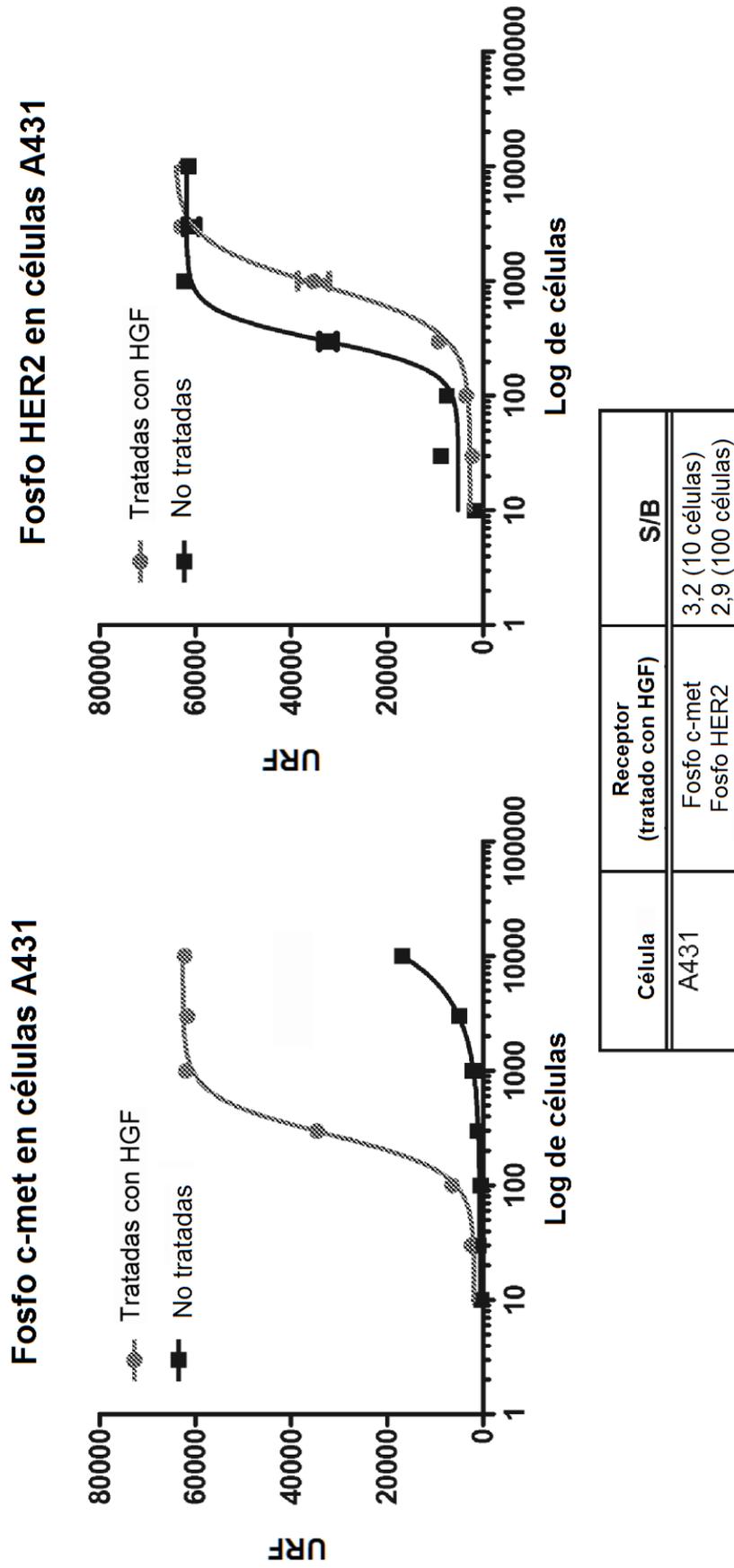
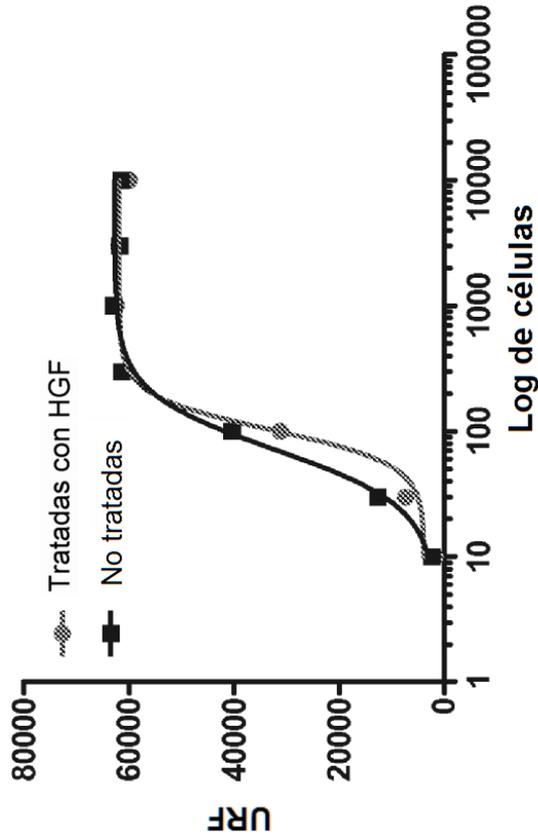
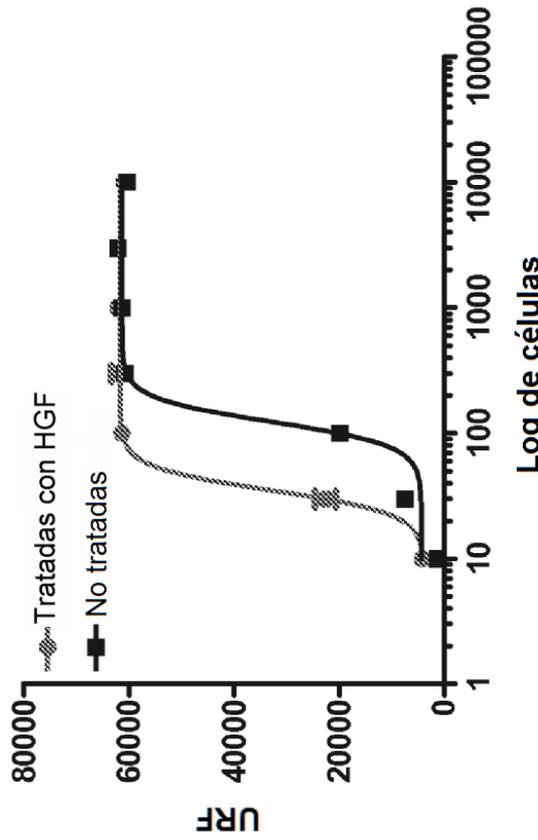


FIG. 3

Fosfo HER2 en células HCC827



Fosfo c-met en células HCC827



Célula	Receptor (tratado con HGF)	S/B
HCC827	Fosfo c-met	60 (10 células)
	Fosfo HER2	3,4 (10 células)

FIG. 4

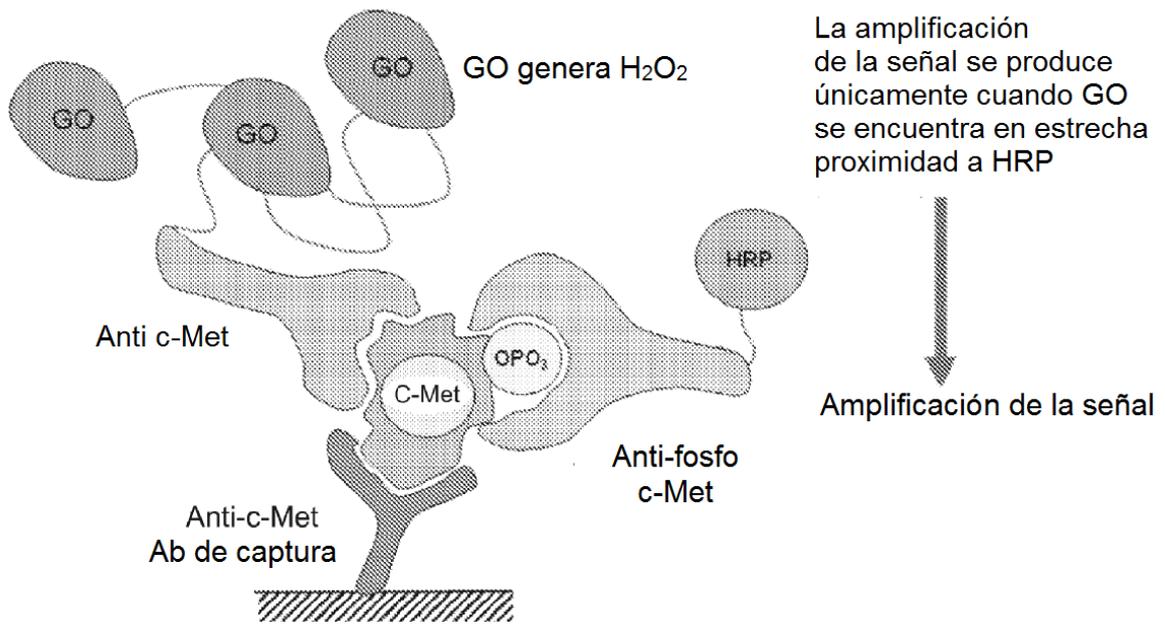


FIG. 5

Chip de c-Met

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A		c-Met			ErbB1			ErbB2			p95ErbB2			ErbB3			IGF-1R			
B																				
C																				
D																				
E		RON			c-Kit			PI3K			SHC			VEGFR1			VEGFR2			
F																				
G																				
H																				
I		VEGFR3																		
J																				
K																				
L																				
M																				
N																				
O																				
P																				
Q											Cont. de CK			Cont. de ensayo			Cont. de impresión			
R																				
S																				
T																				

FIG. 6

Chip de cáncer gástrico

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
A		c-Met		ErbB1		ErbB2		p95ErbB2		ErbB3		IGF-1R								
B																				
C																				
D																				
E		PI3K		SHC		AKT		ERK												
F																				
G																				
H																				
I																				
J																				
K																				
L																				
M																				
N																				
O																				
P																				
Q											Cont. de CK		Cont. de ensayo		Cont. de impresión					
R																				
S																				
T																				

FIG. 7

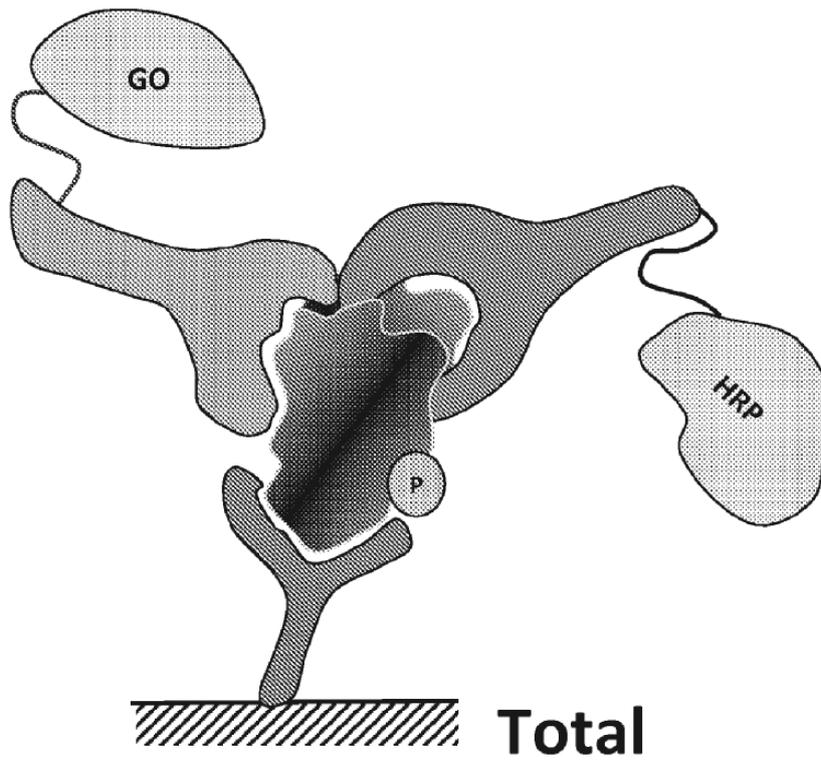
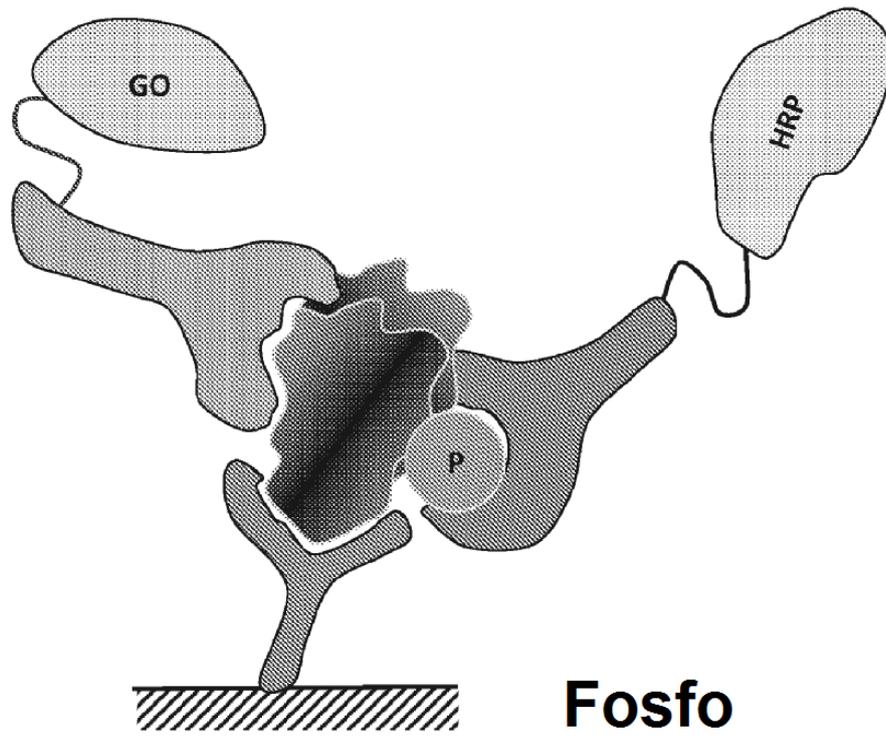
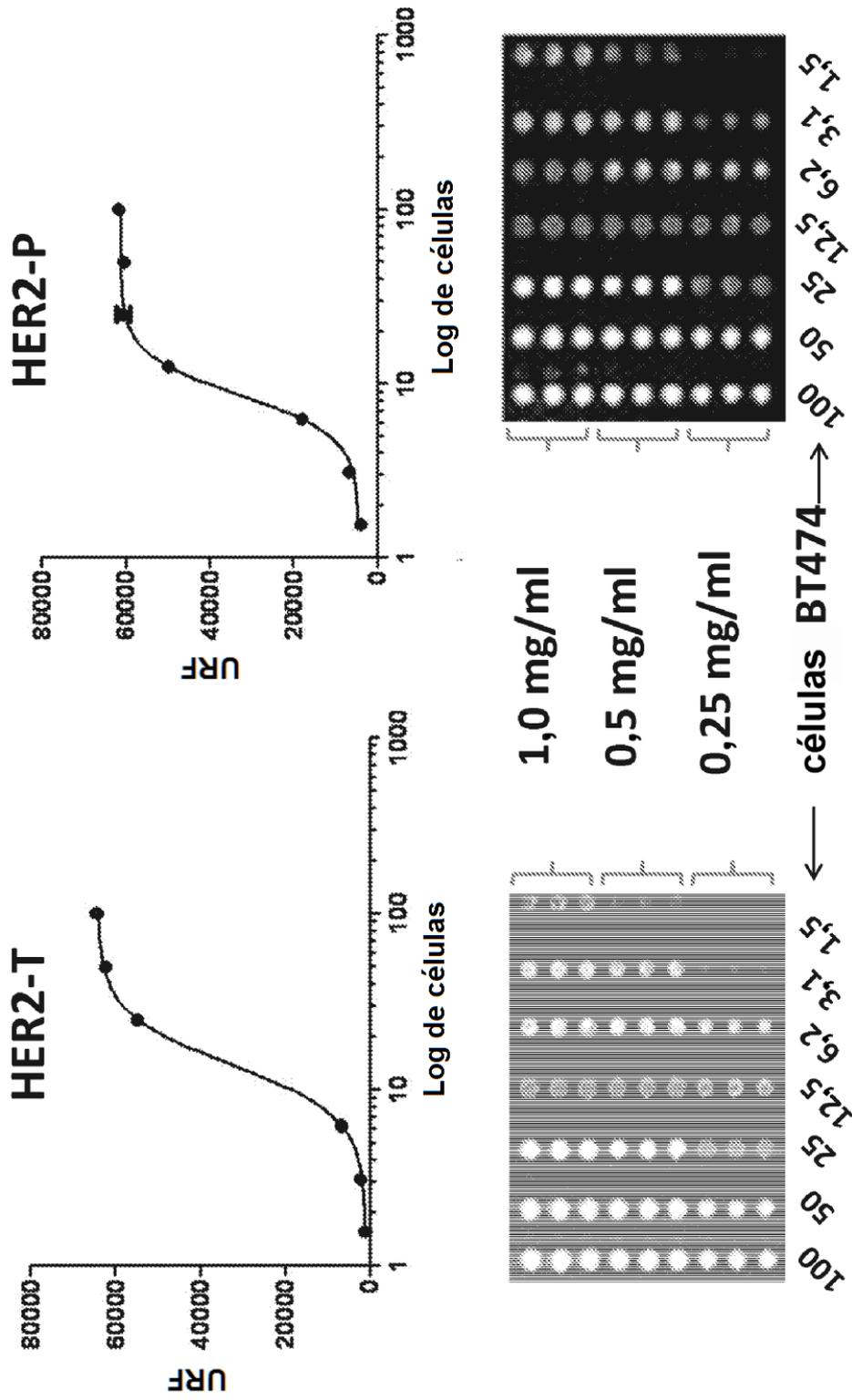


FIG. 8



Curva patrón para cuantificación de HER2

FIG. 9

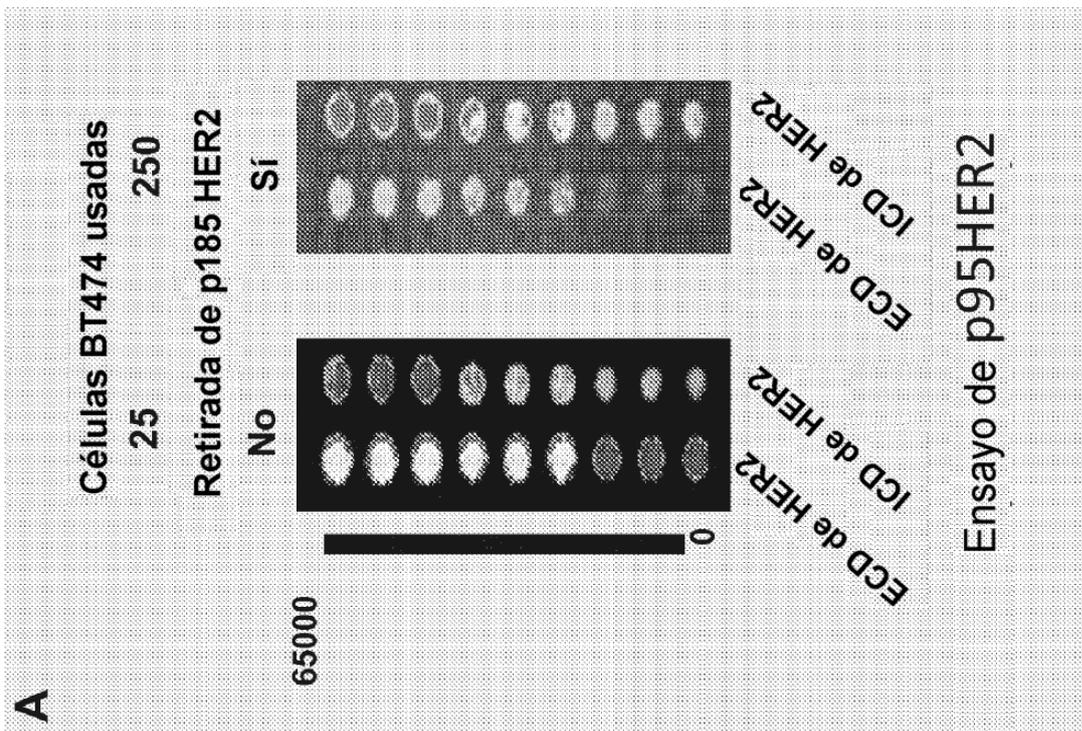
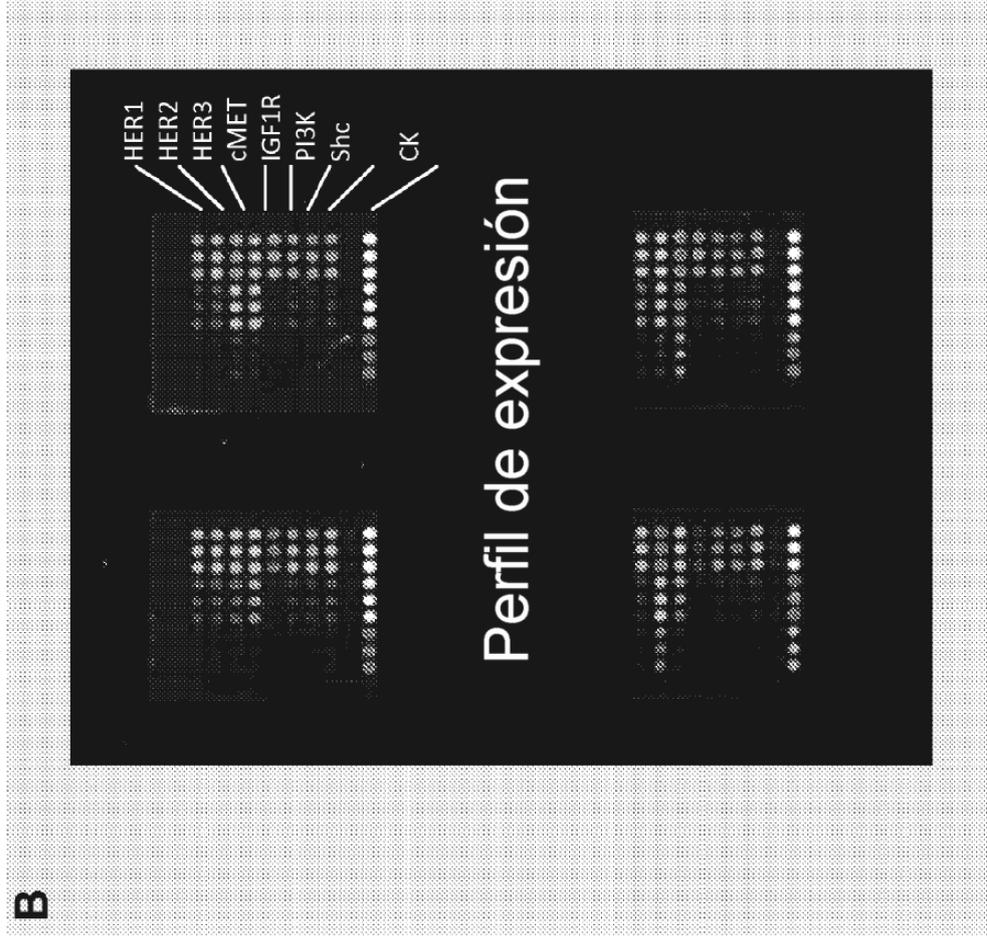


FIG. 10

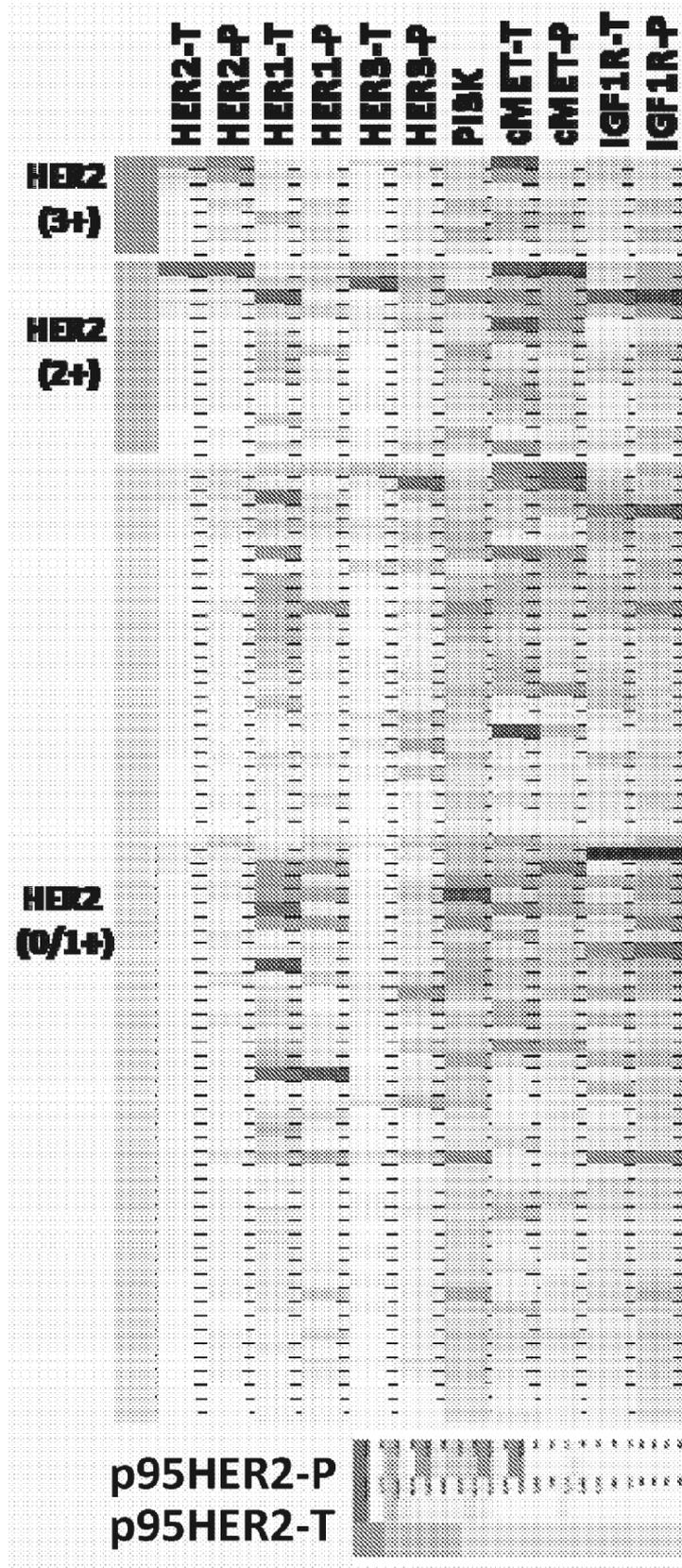
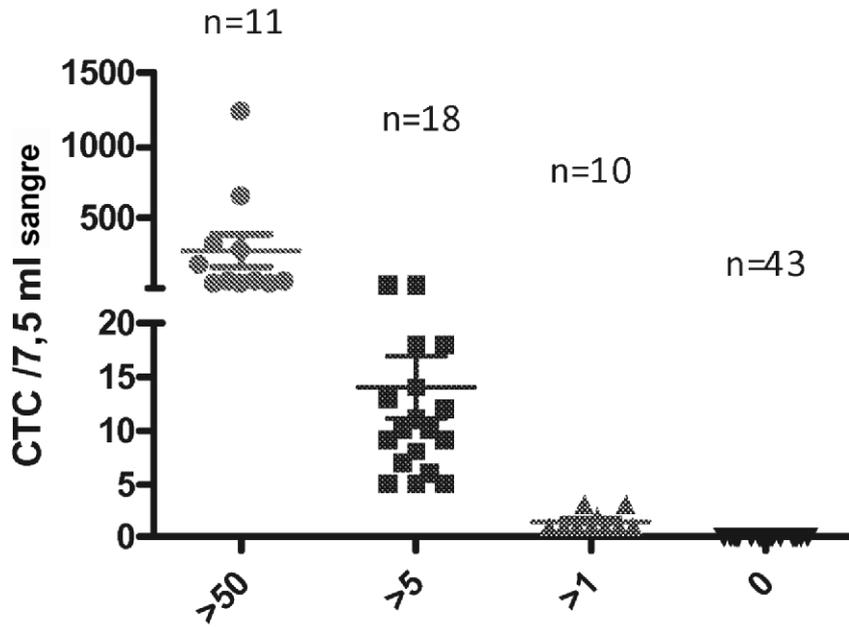


FIG. 11



	CTC	HER2+
positivo	39	12
%	48%	14,6%
rango	1~6000*	1(75) ~ 3(8)
mediana	10	
total	82	

* Estimado

FIG. 12

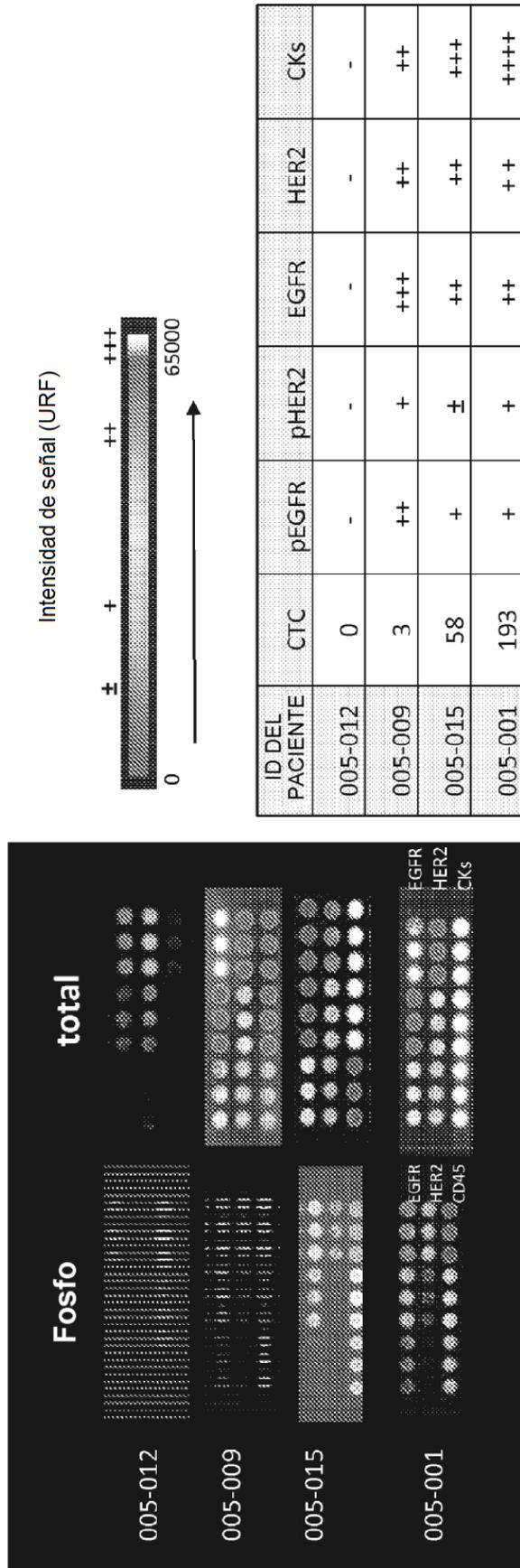


FIG. 13

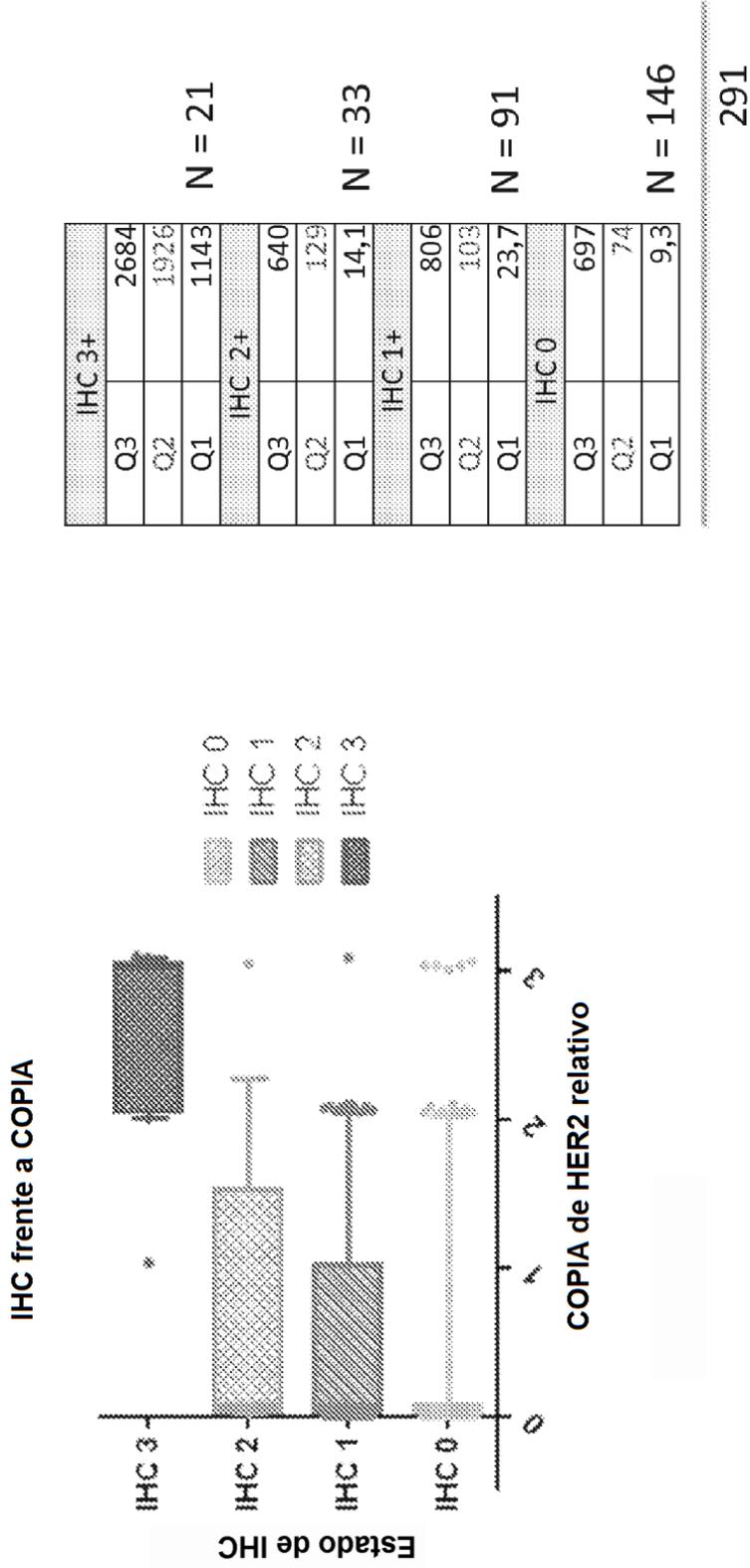


FIG. 14

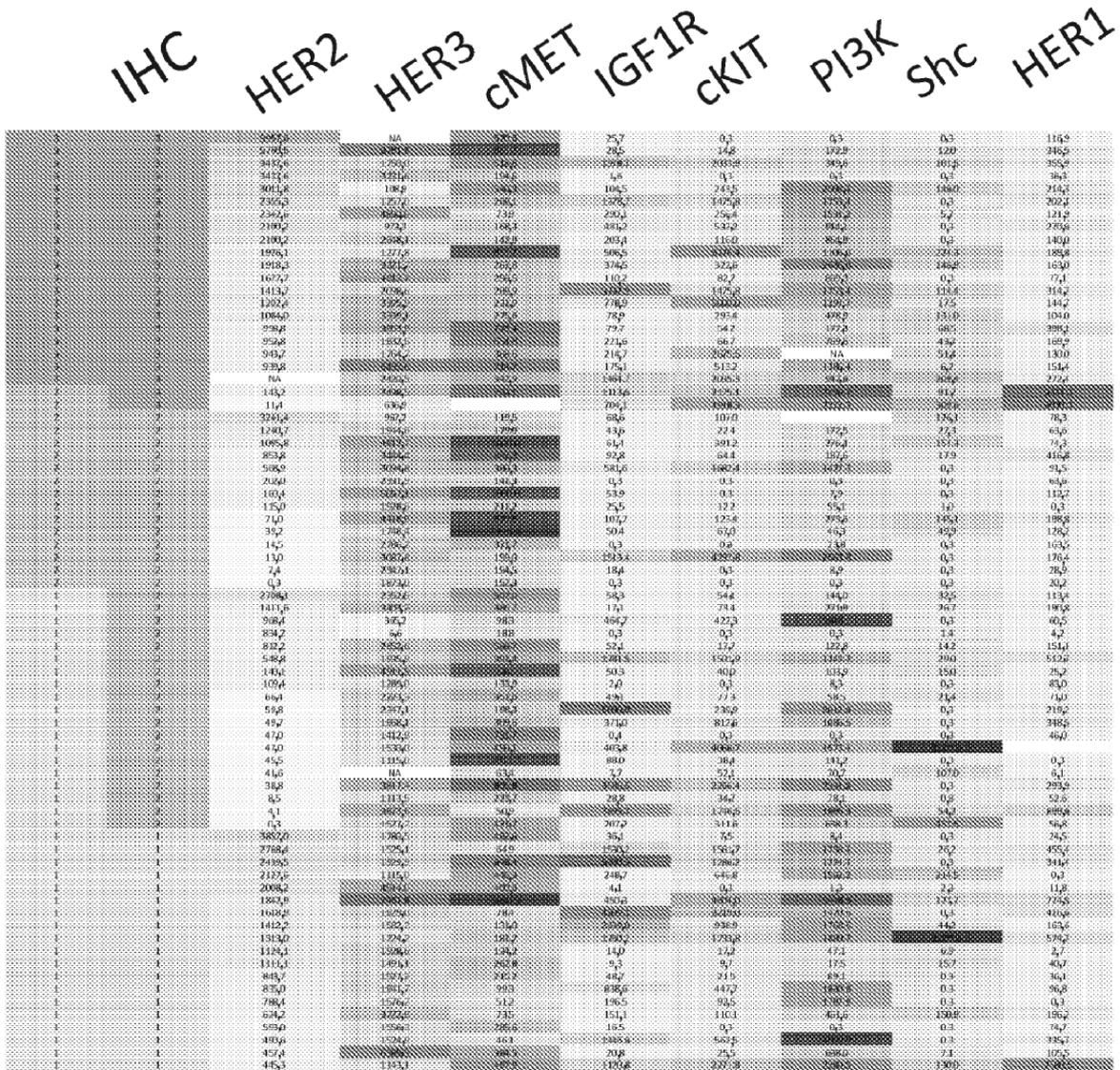


FIG. 15

	IHC	HER2	HER3	cMET	IGF1R	ckIT	PI3K	Shc	HER1
0	0	440.0	540.0	75.0	10.0	0.1	15.0	0.1	53.0
0	0	450.0	112.0	0.0	18.0	54.0	104.0	32.0	0.0
0	0	449.0	289.0	20.0	18.0	18.0	1.0	19.0	50.0
0	0	345.0	140.0	22.0	25.0	40.0	23.0	26.0	86.0
0	0	288.0	211.0	30.0	30.0	98.0	261.0	138.0	37.0
0	0	180.0	NA	25.0	14.0	15.0	470.0	0.0	0.0
0	0	170.0	30.0	7.0	85.0	23.0	24.0	0.0	85.0
0	0	178.0	20.0	10.0	23.0	0.0	28.0	0.0	56.0
0	0	158.0	250.0	88.0	0.0	0.0	0.0	0.0	42.0
0	0	151.0	33.0	7.0	23.0	124.0	80.0	0.0	53.0
U	U	151.0	80.0	19.0	9.0	0.0	10.0	0.0	30.0
0	0	130.0	72.0	15.0	19.0	30.0	18.0	18.0	46.0
0	0	130.0	80.0	84.0	32.0	14.0	54.0	19.0	64.0
0	0	14.0	40.0	18.0	22.0	2.0	10.0	18.0	31.0
0	0	185.0	50.0	21.0	0.0	0.0	86.0	0.0	30.0
0	0	129.0	23.0	32.0	21.0	65.0	36.0	32.0	31.0
0	0	121.0	230.0	28.0	26.0	69.0	80.0	86.0	57.0
0	0	119.0	150.0	22.0	2.0	0.0	22.0	0.0	0.0
0	0	115.0	17.0	91.0	29.0	17.0	73.0	0.0	36.0
0	0	105.0	290.0	21.0	21.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0	0	100.0	15.0	13.0	38.0	0.0	0.0	0.0	9.0
0	0	103.0	10.0	11.0	27.0	0.0	5.0	0.0	12.0
0	0	93.0	28.0	20.0	28.0	17.0	107.0	2.0	36.0
0	0	88.0	84.0	23.0	17.0	45.0	54.0	43.0	96.0
0	0	83.0	79.0	21.0	15.0	13.0	103.0	62.0	21.0
0	0	80.0	110.0	18.0	9.0	0.0	24.0	0.0	15.0
0	0	79.0	30.0	20.0	19.0	14.0	14.0	10.0	58.0
0	0	74.0	30.0	19.0	50.0	2.0	0.0	0.0	19.0
0	0	73.0	9.0	16.0	20.0	17.0	18.0	6.0	26.0
0	0	69.0	100.0	21.0	27.0	25.0	130.0	21.0	29.0
0	0	69.0	4.0	10.0	24.0	3.0	20.0	1.0	35.0
0	0	63.0	10.0	1.0	3.0	0.0	8.0	2.0	83.0
0	0	61.0	26.0	18.0	46.0	12.0	82.0	8.0	77.0
0	0	61.0	114.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	70.0
0	0	52.0	73.0	18.0	15.0	12.0	23.0	11.0	56.0
0	0	50.0	NA	20.0	13.0	13.0	15.0	5.0	2.0
0	0	38.0	100.0	20.0	3.0	0.0	77.0	0.0	137.0
0	0	34.0	71.0	25.0	61.0	0.0	179.0	0.0	120.0
0	0	32.0	19.0	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.0
0	0	28.0	36.0	27.0	31.0	21.0	82.0	86.0	0.0
0	0	29.0	250.0	20.0	25.0	0.0	12.0	7.0	56.0
0	0	22.0	34.0	0.0	12.0	7.0	20.0	28.0	101.0
0	0	21.0	48.0	27.0	20.0	74.0	140.0	40.0	0.0
U	U	20.0	130.0	16.0	7.0	0.0	10.0	0.0	39.0
U	U	18.0	190.0	14.0	11.0	0.0	0.0	0.0	41.0
0	0	17.0	111.0	28.0	1.0	1.0	70.0	7.0	26.0
0	0	16.0	100.0	18.0	14.0	4.0	11.0	11.0	0.0
0	0	15.0	104.0	10.0	8.0	2.0	80.0	15.0	130.0
0	0	10.0	16.0	18.0	2.0	0.0	100.0	21.0	12.0
0	0	14.0	5.0	10.0	5.0	0.0	5.0	0.0	11.0
0	0	14.0	104.0	7.0	7.0	4.0	4.0	3.0	20.0
0	0	13.0	80.0	2.0	18.0	15.0	84.0	0.0	78.0
0	0	12.0	53.0	10.0	29.0	18.0	17.0	0.0	46.0
0	0	12.0	70.0	10.0	21.0	0.0	181.0	10.0	68.0
0	0	12.0	100.0	2.0	24.0	4.0	10.0	14.0	34.0
0	0	11.0	170.0	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0	40.0
0	0	10.0	130.0	22.0	3.0	0.0	0.0	0.0	42.0
0	0	10.0	43.0	20.0	9.0	29.0	130.0	30.0	82.0
0	0	9.0	16.0	13.0	27.0	34.0	21.0	16.0	30.0
0	0	9.0	134.0	10.0	10.0	22.0	30.0	0.0	0.0
U	U	80.0	90.0	12.0	36.0	0.0	9.0	0.0	11.0
U	U	76.0	100.0	12.0	9.0	0.0	0.0	0.0	23.0
0	0	76.0	71.0	29.0	19.0	8.0	186.0	0.0	0.0
0	0	74.0	270.0	6.0	1.0	0.0	4.0	1.0	75.0
0	0	74.0	30.0	16.0	10.0	1.0	8.0	1.0	66.0
0	0	73.0	180.0	10.0	11.0	0.0	13.0	0.0	64.0
0	0	68.0	160.0	13.0	1.0	0.0	0.0	0.0	71.0
0	0	64.0	17.0	13.0	7.0	6.0	49.0	15.0	17.0
0	0	62.0	12.0	9.0	16.0	8.0	41.0	0.0	101.0
0	0	62.0	45.0	11.0	17.0	9.0	13.0	1.0	15.0
0	0	56.0	40.0	7.0	5.0	14.0	13.0	13.0	29.0
0	0	54.0	200.0	8.0	10.0	0.0	23.0	0.0	38.0

FIG. 15
(continuación)

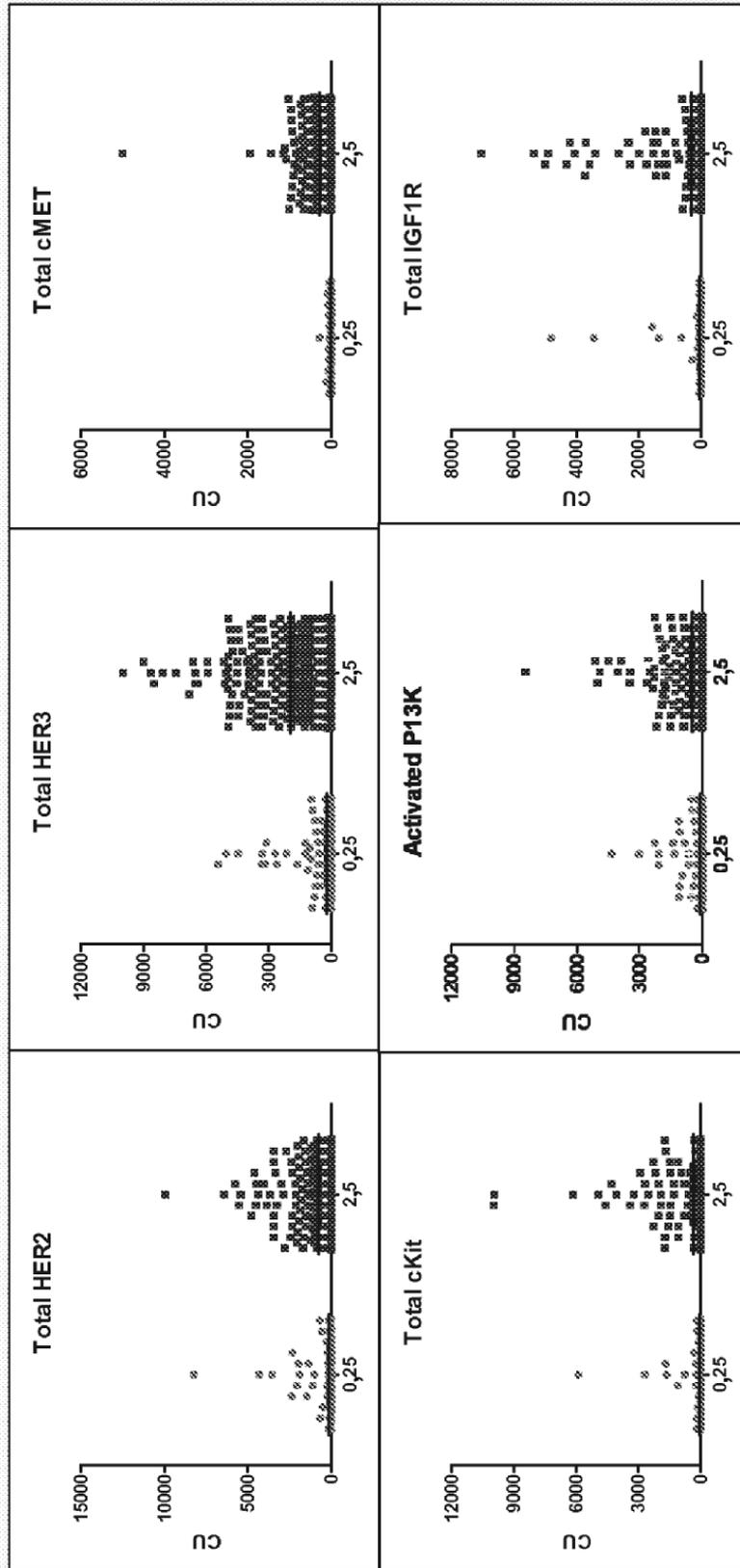


FIG. 16

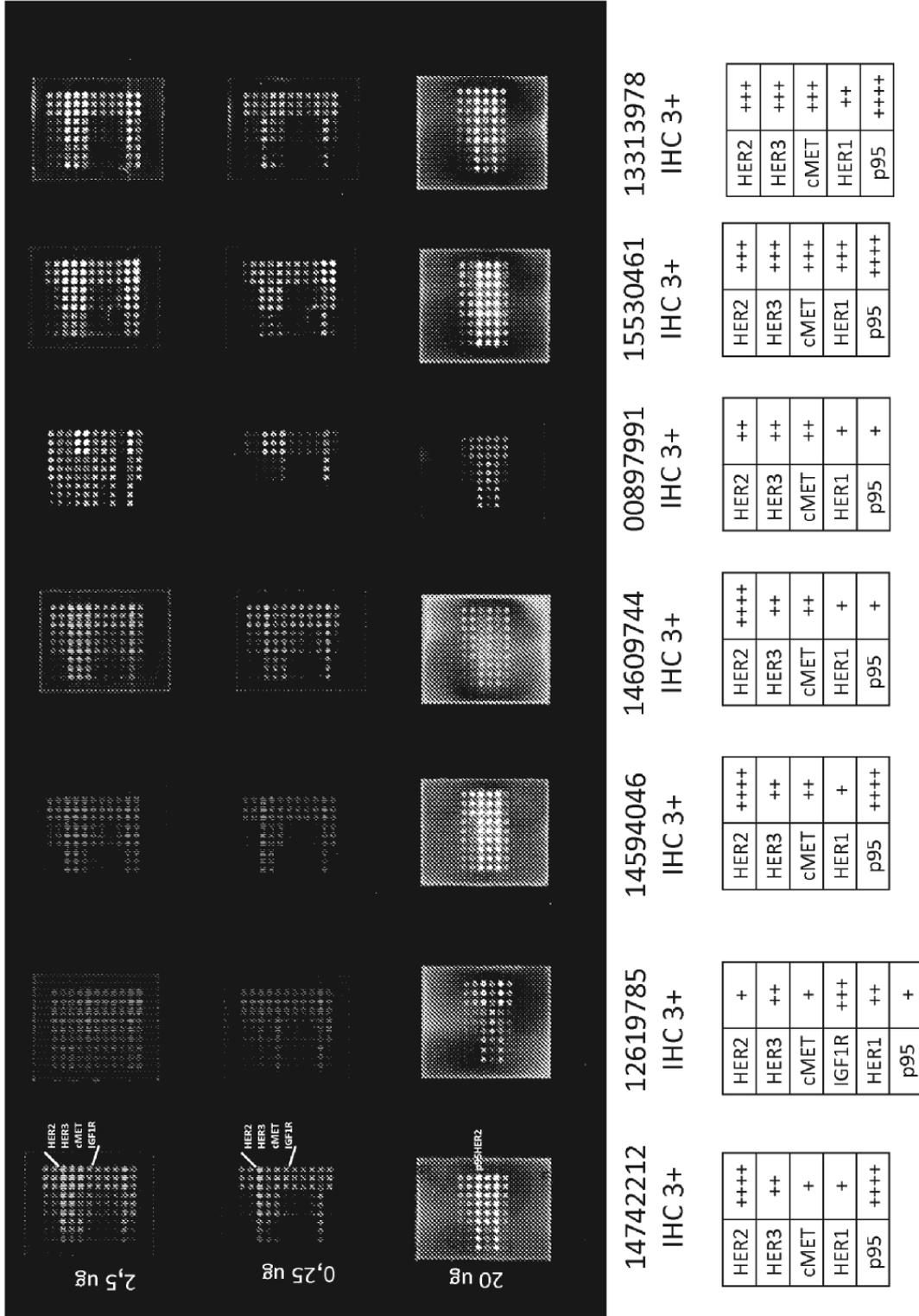
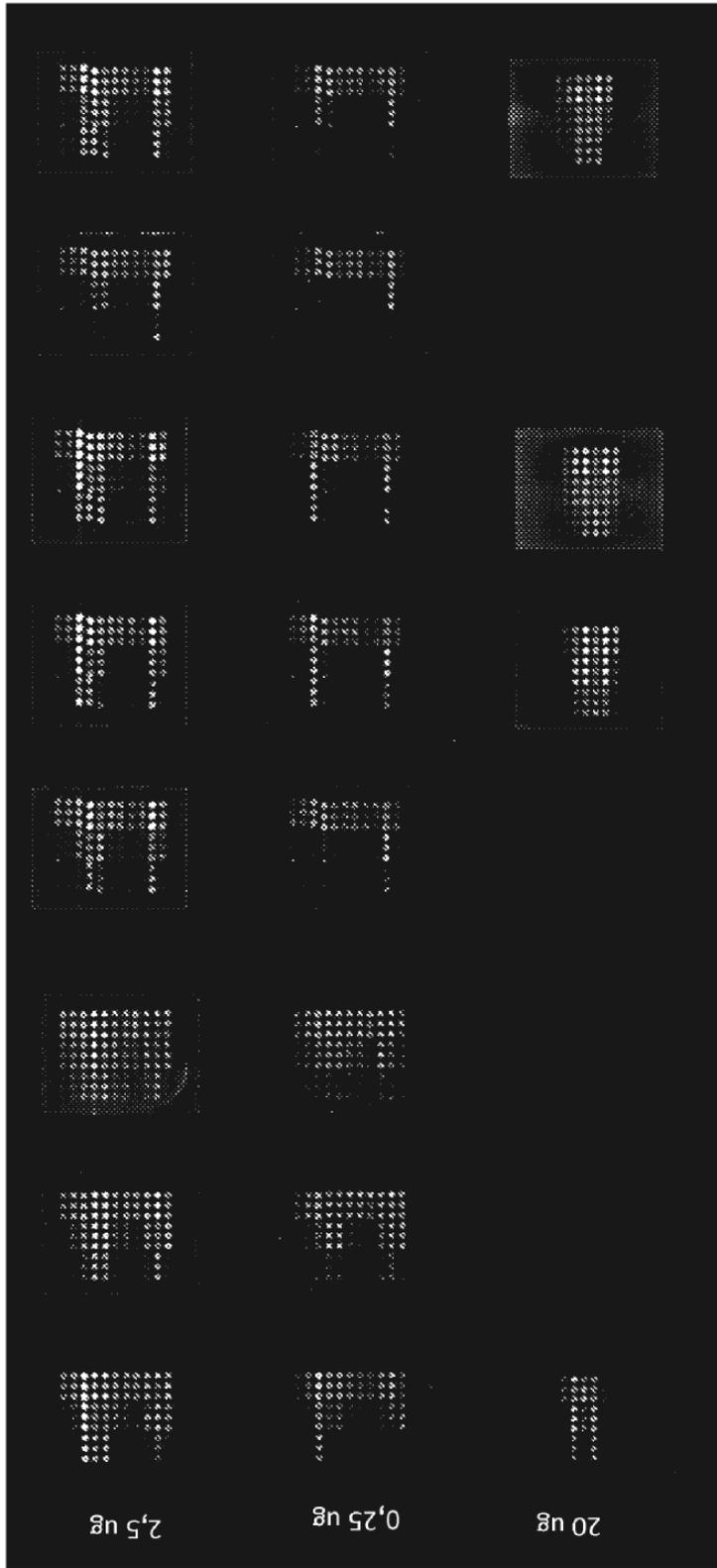


FIG. 17



IgG
HER1
HER2
HER3
cMET
IGF1R
cKIT
PI3K
Shc
CK
HER1-2

15199037	15193905	15286982	13793011	13820467	13755484	13777507	07266206
IHC 3+	IHC 2+	IHC 2+ (1+B)	IHC 1+	IHC 3+	IHC 3+	IHC 0	IHC 3+
HER2 +++	HER2 bajo	HER2 bajo	HER2 bajo	HER2 ++++	HER2 +++	HER2 bajo	HER2 ++
HER3 +	HER3 ++	HER3 ++	HER3 ++	HER3 ++	HER3 ++	HER3 +++	HER3 ++
cMET +	cMET ++	cMET +	cMET +	cMET +	cMET ++	cMET +++	cMET +
HER1 +	HER1 +	HER1 -	HER1 +	HER1 +	HER1 +	HER1 ++	HER1 ++
p95 +	p95 -	p95 -	p95 -	p95 +++	p95 ++	p95 +++	p95 ++

FIG. 18

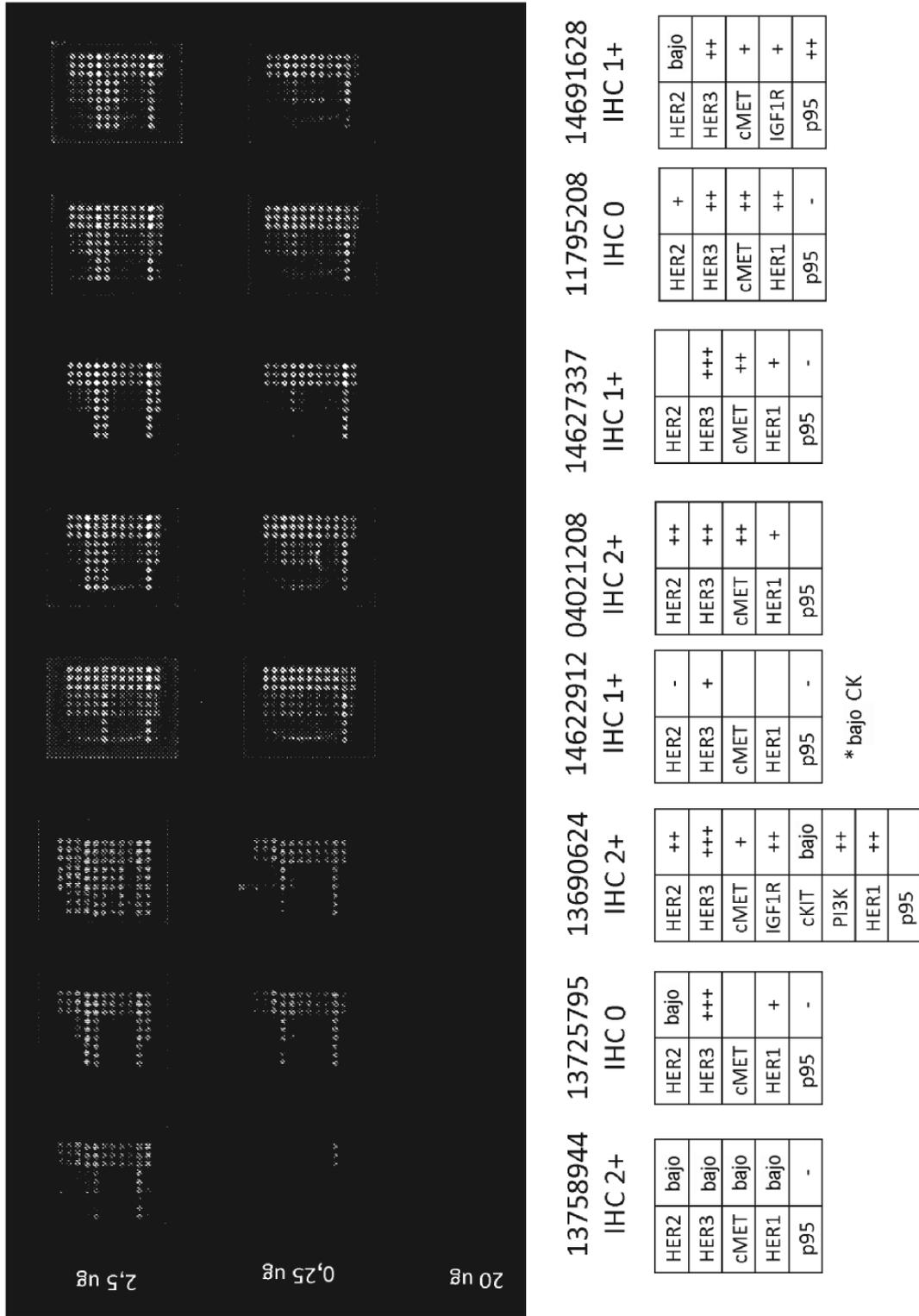


FIG. 19

P95HER2 /20ug

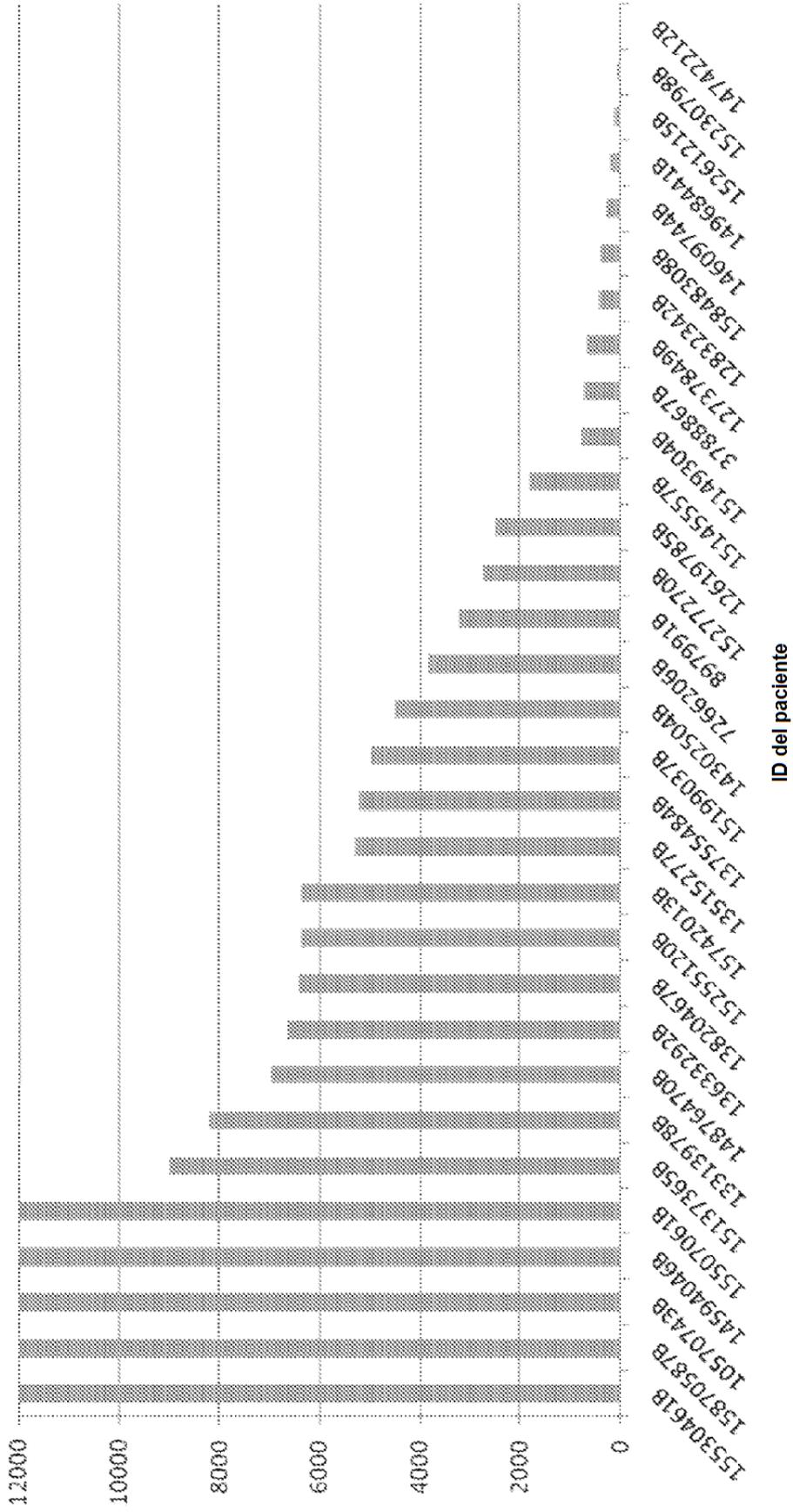


FIG. 20

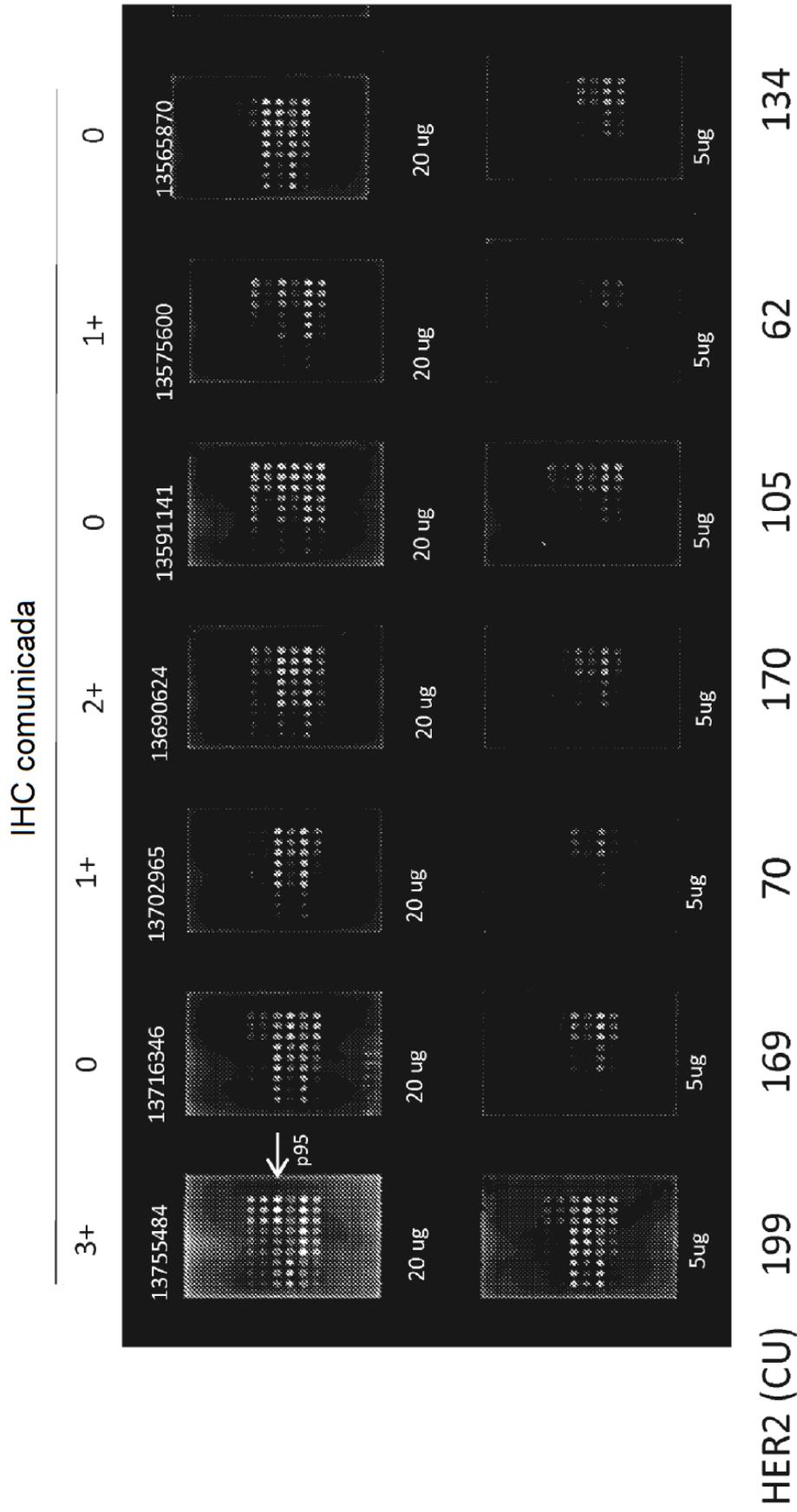


FIG. 21

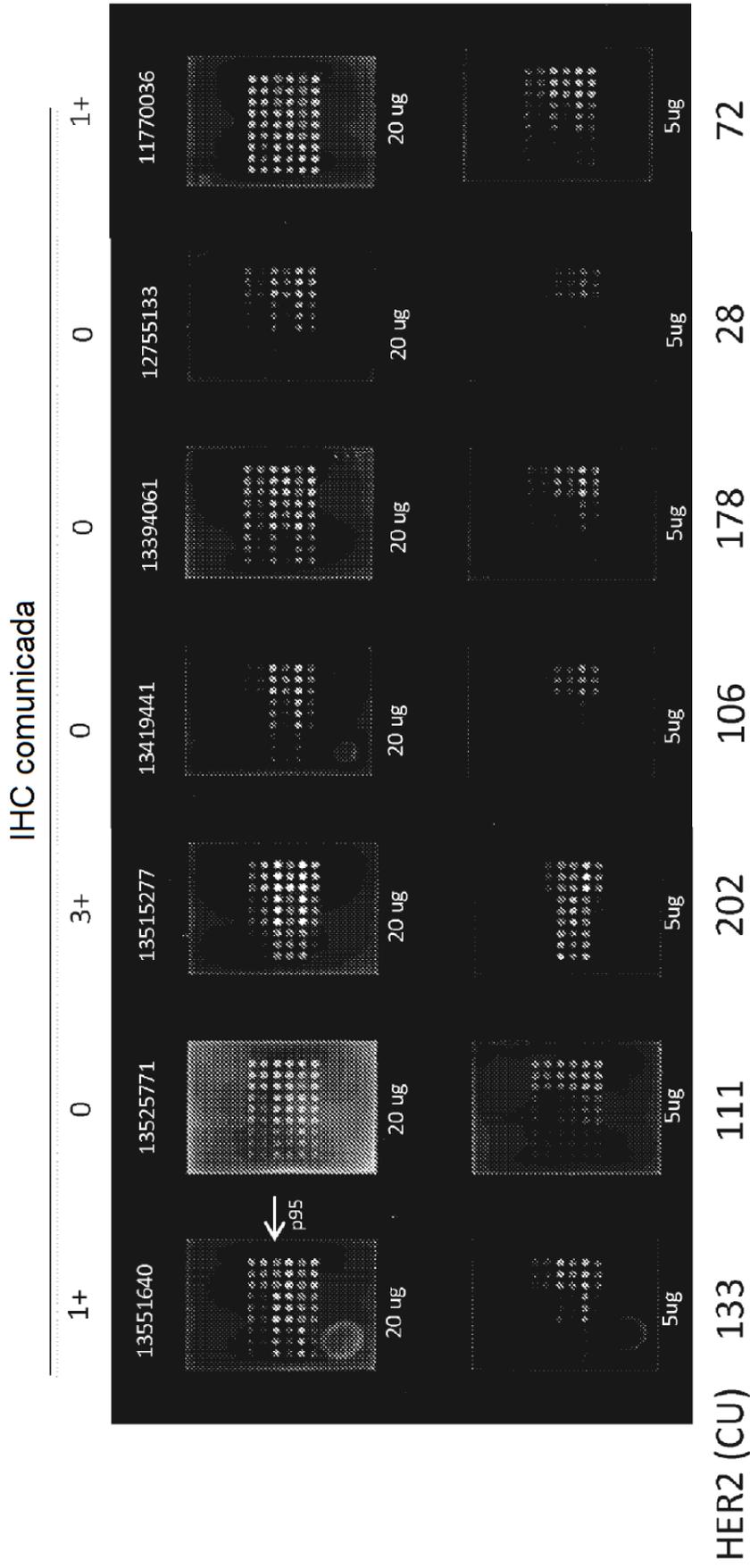


FIG. 22

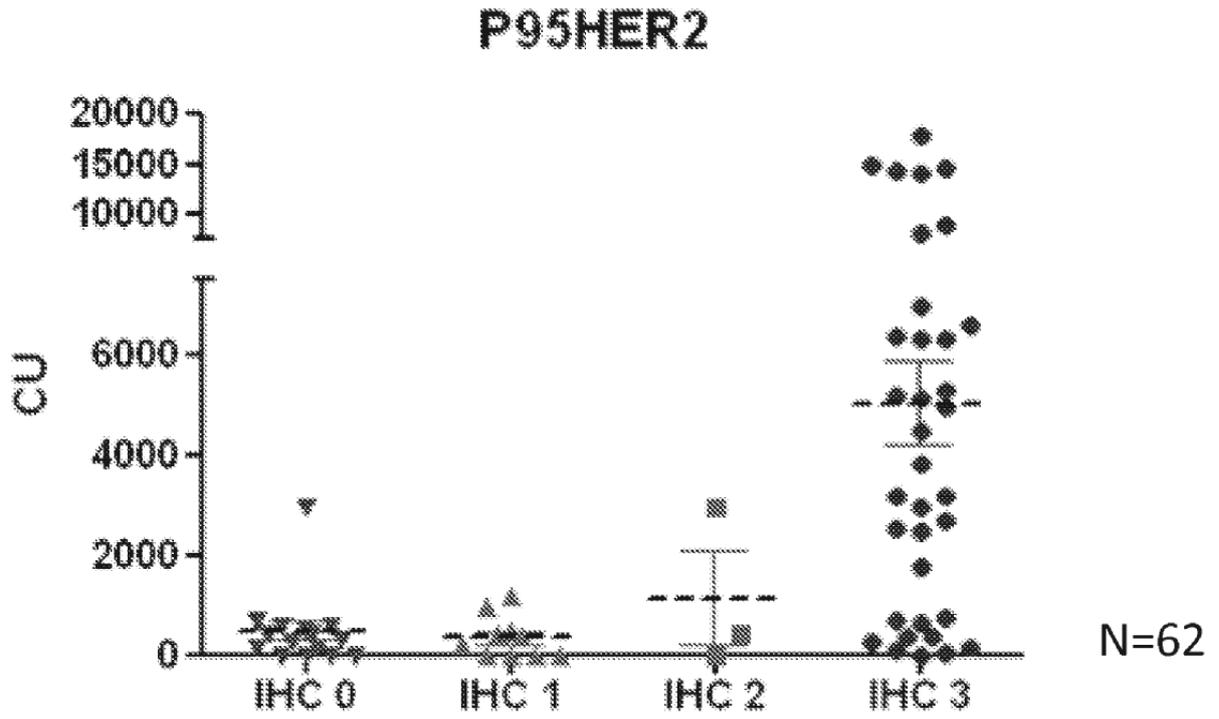


FIG. 23