

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 853**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.10.2010 PCT/US2010/053386**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050069**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2010 E 10769132 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2491385**

54 Título: **Ensayos mediados por proximidad para detectar proteínas de fusión oncogénicas**

30 Prioridad:

20.10.2009 US 253393 P
16.02.2010 US 305084 P
23.04.2010 US 327487 P
15.09.2010 US 383037 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2017

73 Titular/es:

DIATECH HOLDINGS, INC. (100.0%)
405 Duke Drive, Suite 240
Franklin, TN 37067, US

72 Inventor/es:

SINGH, SHARAT y
LIU, XINJUN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 637 853 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

Ensayos mediados por proximidad para detectar proteínas de fusión oncogénicas

5 **Antecedentes de la invención**

10 Las proteínas de fusión, también conocidas como proteínas quiméricas, son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes que originalmente codifican proteínas separadas. La traducción de este gen de fusión da como resultado un único polipéptido con propiedades funcionales obtenidas a partir de cada una de las proteínas originales. Las proteínas mutantes quiméricas se producen cuando una mutación a gran escala, por lo general una translocación cromosómica, crea una nueva secuencia codificante que contiene partes de las secuencias codificantes de dos genes diferentes. Las proteínas de fusión de origen natural son importantes en el cáncer, en el que funcionan como oncoproteínas.

15 La proteína de fusión BCR-ABL es un ejemplo bien conocido de una proteína de fusión oncogénica. Se considera que es el principal conductor oncogénico de la leucemia mielógena crónica (CML), pero también se asocia con la leucemia linfoblástica aguda (ALL). De hecho, el sello distintivo citogenético de la CML es el cromosoma de Filadelfia (Ph), que da como resultado la formación del gen de fusión *BCR-ABL* que codifica una proteína de 210 kDa. De hecho, la proteína de fusión BCR-ABL resultante es una tirosina quinasa activa que es fundamental para la patogénesis de la CML. Aunque en la actualidad el imatinib (Gleevec®) es la terapia de primera línea para pacientes recién diagnosticados con CML, aproximadamente un 20-25 % de los pacientes no consiguen respuestas citogenéticas completas duraderas. Los estudios han mostrado que la reactivación de la señalización de BCR-ABL en presencia de tratamiento continuado con imatinib es la principal causa de resistencia. En la mayoría de los pacientes, la reactivación resulta de mutaciones en el dominio de BCR-ABL quinasa que alteran la unión a imatinib y conducen a la inducción de resistencia a fármacos. Como tal, la medición de la actividad de BCR-ABL encuentra utilidad en la predicción de la respuesta a la terapia con inhibidores de tirosina quinasa tales como el imatinib así como en la identificación de pacientes que desarrollan resistencia a los inhibidores de este tipo.

30 En la actualidad, los métodos disponibles para detectar la actividad de BCR-ABL se basan en la medición de CRKL fosforilado (pCRKL), un sustrato de BCR-ABL. Por ejemplo, La Rosée *et al.* (Haematologica, 93: 765-9 (2008)) describe un análisis de transferencia de Western de lisados de leucocitos totales para determinar el nivel de pCRKL como un sustituto de la actividad de BCR-ABL (véase también, Hochhaus *et al.*, Leukemia, 16: 2190-6 (2002); White *et al.*, J. Clin. Oncol., 25: 4445-51 (2007)). De forma análoga, Khorashad *et al.* (Haematologica, 94: 861-4 (2009)) describe un método basado en citometría de flujo para medir el nivel de pCRKL para evaluar la actividad de BCR-ABL (véase también, Hamilton *et al.*, Leukemia, 20: 1035-9 (2006)). Sin embargo, estos métodos carecen de la especificidad y sensibilidad que se requiere para determinar la presencia o nivel de actividad de BCR-ABL en una muestra porque son ensayos de anticuerpos individuales que se basan en la detección de la fosforilación de una proteína sustituta.

40 El documento EP 1507147 se refiere a la detección, entre otros, de proteínas de fusión específicas de tumores.

El documento WO 98/53317 se refiere al campo del diagnóstico del cáncer y a la aplicación de técnicas de diagnóstico en patología y hematología. De forma específica, la invención se refiere a técnicas para la detección de anomalías cromosómicas y a la detección de productos génicos específicos de tumores expresados exclusivamente por células tumorales que contienen dichas anomalías cromosómicas.

El documento WO 2009/108637 proporciona composiciones y métodos para detectar los estados de activación de componentes de vías de transducción de señales en células tumorales.

50 El documento WO 2007/061684 se refiere a la detección de productos génicos resultantes de translocaciones cromosómicas, incluyendo proteínas de fusión que comprenden una primera y una segunda región. En particular, las proteínas de fusión se identifican después de someter una muestra que comprende las proteínas a una perla que comprende un anticuerpo para una primera región, seguido de someter el complejo de perla-anticuerpo-fusión a un segundo anticuerpo dirigido contra la segunda región, detectando de ese modo la proteína de fusión.

55 El documento US 2005/214301 proporciona anticuerpos aislados que se unen de forma específica a la proteína de fusión BCR-ABL P210 humana, pero no se unen a las respectivas proteínas BCR y c-ABL de tipo silvestre. La detección de esta proteína de fusión es relevante para la CML y otras enfermedades caracterizadas por la translocación de BCR-ABL P210. También se proporcionan métodos para determinar el nivel o expresión de BCR-ABL P210 en una muestra biológica, o para identificar un compuesto que modula dicha expresión, usando los anticuerpos específicos de BCR-ABL desvelados.

60 De Keersmaecker *et al.* (2005); Blood: 105 (12) demuestran la participación de fusiones de *ABL1* en la patogénesis de T-ALL e identifican EML1-ABL1 como una nueva diana terapéutica de imatinib.

65 Guo *et al.* (1991); Cancer Res: 51; 3048 se refiere a la detección de Proteínas BCR-ABL en Células Sanguíneas

Pacientes con Leucemia Mielógena Crónica de Fase Benigna.

Por consiguiente, se necesitan métodos específicos y sensibles para detectar la actividad de BCR-ABL, así como la actividad de otras proteínas de fusión oncogénicas, con fines diagnósticos, pronósticos y terapéuticos. La presente invención satisface esta necesidad y también proporciona ventajas relacionadas.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona matrices basadas en anticuerpo para detectar el estado de activación y/o cantidad total de una o una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas en una muestra biológica tal como sangre completa (por ejemplo, un lisado preparado a partir de células en circulación raras aisladas o leucocitos) o tejido tumoral (por ejemplo, una aspiración con aguja fina) y sus métodos de uso de los mismos. En ciertos casos, el estado de activación y/o cantidad total de proteína o proteínas de fusión oncogénica(s) presente en una muestra se puede medir en combinación con una pluralidad de moléculas de moléculas de transducción de señales. Las composiciones y métodos de la presente invención tienen las ventajas de la especificidad asociada a ensayos de inmunoabsorción relacionados con enzimas, sensibilidad asociada con amplificación de señal, y multiplexación de alto rendimiento asociada micromatrices.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar el nivel o estado de activación de una proteína de fusión oncogénica, método que comprende:

- (a) producir un extracto celular que comprende un extracto de células aisladas a partir de una muestra, en el que las células aisladas no se lavan antes de la lisis para producir el extracto celular;
- (b) poner en contacto un extracto celular con un primer resto de unión específico para un primer dominio de una primera proteína de longitud completa en condiciones adecuadas para transformar la primera proteína de longitud completa presente en el extracto celular en un complejo que comprende la primera proteína de longitud completa y el primer resto de unión, en el que el primer dominio de la primera proteína de longitud completa está ausente de una proteína de fusión oncogénica correspondiente que comprende un segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa fusionado a un primer dominio de una segunda proteína de longitud completa diferente;
- (c) retirar el complejo de la etapa (b) del extracto celular para formar un extracto celular desprovisto de la primera proteína de longitud completa;
- (d) poner en contacto el extracto celular de la etapa (c) con un segundo resto de unión, un tercer resto de unión, y un cuarto resto de unión en condiciones adecuadas para transformar la proteína de fusión oncogénica presente en el extracto celular en un complejo que comprende la proteína de fusión oncogénica y el segundo, tercer, y cuarto restos de unión;

en el que el segundo resto de unión es específico para el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa, en el que el segundo resto de unión está sujeto en un soporte sólido en una matriz direccionable, en el que el tercer resto de unión está etiquetado con una glucosa oxidasa y es específico para uno de los siguientes: (i) el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente; (ii) el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa; o (iii) el sitio de fusión entre el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa y el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente, en el que el cuarto resto de unión está etiquetado con un primer miembro de un par de amplificación de señales y es específico para el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente, y en el que la glucosa oxidasa genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;

- (e) incubar el complejo de la etapa (d) con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
- (f) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales, determinando de ese modo el nivel o estado de activación de la proteína de fusión oncogénica.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método como se describe en [0006a], en el que la muestra se selecciona entre el grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspiración a través del pezón, linfa, saliva, aspiración con aguja fina (FNA), y combinaciones de los mismos. En una realización la muestra se obtiene a partir de un paciente con cáncer. El cáncer está causado por la formación de una proteína de fusión oncogénica debido a una translocación cromosómica en las células cancerosas. En una realización el cáncer es una neoplasia hematológica, sarcoma osteogénico, o sarcoma de tejido blando. La neoplasia hematológica es una leucemia o linfoma. La leucemia es una leucemia mielógena crónica (CML).

En un aspecto, la presente invención proporciona un método como se describe en [0006a-b], en el que la proteína de fusión oncogénica se selecciona entre el grupo que consiste en BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RARa-PML, IREL-URG, CBF/3-MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-Cc, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET, y combinaciones de los mismos. En una realización, la proteína de

fusión oncogénica es BCRABL.

En una realización de la presente invención, la primera proteína de longitud completa es BCR, o en el que el primer dominio de la primera proteína de longitud completa comprende la región carboxilo-terminal de BCR (BCRC), en la que el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa comprende la región amino-terminal de BCR (BCR-N), o en la que la segunda proteína de longitud completa diferente es ABL, o en el que el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente comprende la región carboxilo-terminal de ABL (ABL-C), o en la que la primera proteína de longitud completa es ABL, o en la que la segunda proteína de longitud completa diferente es BCR.

En una realización el método es como se describe en [0006a-d], en el que el estado de activación se selecciona entre el grupo que consiste en un estado de fosforilación, estado de ubiquitinación, estado de formación de complejos, y combinaciones de los mismos, o que comprende adicionalmente determinar el nivel o estado de activación de una o más moléculas de transducción de señales, siendo dicha una o más moléculas de transducción de señales opcionalmente un sustrato de BCR-ABL, siendo dicho sustrato de BCR-ABL seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en CRKL, JAK2, STAT5, VAV, BAP-1, y combinaciones de los mismos.

En una realización el método es como se describe en [0006a-d], en el que el tercer resto de unión está etiquetado directamente con la glucosa oxidasa, o en el que el cuarto resto de unión está etiquetado directamente con el primer miembro del par de amplificación de señales, o en el que el cuarto resto de unión está etiquetado con el primer miembro del par de amplificación de señales a través de la unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con el segundo anticuerpo de detección y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de señales.

En una realización el método es como se describe en [0006a-f], que comprende adicionalmente:

- (g) poner en contacto el extracto celular con un quinto resto de unión específico para un segundo dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente en condiciones adecuadas para transformar la segunda proteína de longitud completa diferente presente en el extracto celular en un complejo que comprende la segunda proteína de longitud completa diferente y el quinto resto de unión, en el que el segundo dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente está ausente de la proteína de fusión oncogénica; y
- (h) retirar el complejo de la etapa (g) del extracto celular para formar un extracto celular desprovisto de la segunda proteína de longitud completa diferente,

en el que la etapa (g) se realiza antes, durante, o después de la etapa (b).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para el tratamiento de cáncer, método que comprende:

- (a) lisar las células cancerosas aisladas de un sujeto después de la administración de un fármaco anticáncer para producir un extracto celular, en el que las células cancerosas aisladas no se lavan antes de la lisis;
- (b) medir un nivel de expresión y/o activación de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular 10 de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25; y
- (c) comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y
- (d) determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (d). En una realización, la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL, o en la que se determina que el sujeto tiene células cancerosas que expresan la proteína de fusión oncogénica antes de recibir el ciclo de terapia, siendo dicho sujeto opcionalmente positivo para BCR- ABL. En otra realización, en la que tanto el nivel de expresión como el nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica se miden en el extracto celular, dicha etapa (b) además comprende opcionalmente calcular una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total, dicha etapa (c) comprende opcionalmente comparar la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total con respecto a una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total calculada para el sujeto en un momento anterior. En otra realización más, la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total se correlaciona con el porcentaje de inhibición de la proteína de fusión oncogénica activada después del tratamiento con el fármaco anticáncer, o en la que la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total es relativa con respecto al nivel de una proteína de control, o en la que la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total comprende una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total. En una realización, la proteína de control comprende una proteína de longitud completa nativa que contiene secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica, o en la que la proteína de control se selecciona entre el grupo que consiste en BCR de longitud completa, ABL de longitud completa, y combinaciones de los mismos.

En una realización el método es como se describe en [0006h], en el que menos de aproximadamente un 50 % de inhibición del nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica indica una necesidad de aumentar la dosis posterior del ciclo de terapia o administrar un ciclo de terapia diferente, o en el que menos de aproximadamente un 50 % de inhibición del nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica indica una falta de cumplimiento del ciclo de terapia por parte del paciente, la existencia de posibles efectos secundarios o toxicidad asociados con el ciclo de terapia, o combinaciones de los mismos, o en el que más de aproximadamente un 80 % de inhibición del nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica indica que el sujeto está con el ciclo de terapia correcto con la dosis correcta.

En otra realización el método es como se describe en [0006h-i], en el que el cáncer es leucemia mielógena crónica (CML), o en el que el fármaco anticáncer se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, inhibidor de tirosina quinasa, agente quimioterapéutico, agente terapéutico hormonal, agente radioterapéutico, vacuna, y combinaciones de los mismos, dicho inhibidor de tirosina quinasa se selecciona entre el grupo que consiste en mesilato de imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib (SKI-606), y combinaciones de los mismos.

En un aspecto la presente invención se refiere a un método descrito en [0006j], en el que las etapas (b) a (d) como alternativa comprenden:

- (b') medir un nivel de expresión y/o activación de una proteína de fusión oncogénica y una o más moléculas de transducción de señales en su ruta en el extracto celular; y
- (c') comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y
- (d') determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (c').

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer, o para identificar la respuesta de un cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer, o para predecir la respuesta de un sujeto que tiene cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer, o para determinar si un sujeto que tiene cáncer es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer, método que comprende:

- (a) lisar las células cancerosas aisladas de un sujeto después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer, para producir un extracto celular, en el que las células cancerosas aisladas no se lavan antes de la lisis;
- (b) medir un nivel de expresión y/o activación de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25; y
- (c) determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer, identificar el cáncer como que responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer,

predecir la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer, determinar si el sujeto es resistente o responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a un método como se describe en [0006l], en el que el cáncer es leucemia mielógena crónica (CML), o en el que el fármaco anticáncer se selecciona entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, inhibidor de tirosina quinasa, agente quimioterapéutico, agente terapéutico hormonal, agente radioterapéutico, vacuna, y combinaciones de los mismos, siendo dicho anticuerpo monoclonal seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, y combinaciones de los mismos, siendo dicho inhibidor de tirosina quinasa seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en mesilato de imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib (SKI-606), gefitinib, sunitinib, erlotinib, lapatinib, canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), leflunomida (SU101), vandetanib (ZD6474), y combinaciones de los mismos, siendo dicho agente quimioterapéutico seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en pemetrexed, gemcitabina, sirolimus (rapamicina), análogos de rapamicina, compuestos de platino, carboplatino, cisplatino, satraplatino, paclitaxel, docetaxel (Taxotere®), temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), y combinaciones de los mismos, siendo dicho agente terapéutico hormonal seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en inhibidores de aromatasa, moduladores selectivos de receptor de estrógenos, esteroides, finasterida, agonistas de hormona liberadora de gonadotropina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos,

derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos, siendo dicho agente radioterapéutico seleccionado opcionalmente entre el grupo que consiste en ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}A , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{212}Bi , y combinaciones de los mismos.

- 5 Otros objetos, características, y ventajas de la presente invención serán evidentes para alguien con experiencia en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra una realización del formato de ensayo de la presente invención, que depende de la co-localización de dos anticuerpos detectores adicionales relacionados con enzimas para sucesos de canalización posterior para cada proteína de fusión oncogénica diana unida.
- 15 La Figura 2 muestra de forma esquemática la aplicación de las matrices de la invención a la selección de fármaco durante el transcurso del tratamiento para el cáncer.
- Las Figuras 3 A-D muestran diversas realizaciones del formato de ensayo de la presente invención para detectar niveles de expresión y activación de proteínas de fusión oncogénicas tales como BCR-ABL.
- 20 La Figura 4 muestra la señal de BCR-ABL en células K562 después de la retirada de la BCR libre.
- La Figura 5 muestra la señal de BCR en células K562 después de la retirada de la BCR libre.
- 25 La Figura 6 muestra la detección de los niveles totales y fosforilados de BCR-ABL en células K562.
- La Figura 7 muestra el nivel de fosforilación ("BCR-ABL Fosfo ") y la cantidad total ("BCR-ABL Total") de BCR-ABL detectado en células K562 de leucemia mielógena crónica humana con o sin disminución de BCR libre usando perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR.
- 30 La Figura 8 muestra la señal de BCR-ABL fosforilada en células K562 con o sin retirada de BCR libre usando perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR. En particular, la Figura 8A proporciona una comparación de la micromatriz de la señal de BCR-ABL fosforilada en lisados de células K562 con o sin retirada de BCR de longitud completa ("Perlas no tratadas" = BCR no retirada con respecto a "Perlas tratadas" = BCR retiradas con perlas que contiene un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa conjugada con el mismo). La Figura 8B proporciona una representación gráfica de los datos de la micromatriz con Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) como una función del índice celular.
- 35 La Figura 9 muestra la señal de BCR-ABL total en células K562 con o sin retirada de BCR libre usando perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR. En particular, la Figura 9A proporciona una comparación de la micromatriz de la señal de BCR-ABL total detectada en lisados de células K562 con o sin retirada de BCR de longitud completa ("Perlas no tratadas" = BCR no retirada con respecto a "Perlas tratadas" = BCR retiradas con perlas que contiene un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa conjugada con el mismo). La Figura 9B proporciona una representación gráfica de los datos de la micromatriz con Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) como una función del índice celular.
- 45 La Figura 10 muestra la retirada de BCR libre de longitud completa a partir de un extracto de células K562 después de poner en contacto el extracto celular con perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR. En particular, la Figura 10A proporciona una comparación de la micromatriz de la señal de BCR total detectada en lisados de células K562 con o sin retirada de BCR de longitud completa ("Perlas no tratadas" = BCR no retirada con respecto a "Perlas tratadas" = BCR retiradas con perlas que contiene un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa conjugada con el mismo). La Figura 10B proporciona una representación gráfica de los datos de la micromatriz con Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) como una función del índice celular.
- 50 La Figura 11 muestra que la BCR libre de longitud completa y las proteínas ABL, pero no la proteína de fusión BCR-ABL, están presentes en los glóbulos blancos (WBC).
- 55 La Figura 12 muestra que la BCR libre de longitud completa presente en los WBC inhibía la señal de BCR-ABL fosfo en extractos de células K562 cuando tales extractos de células K562 se fijaron con extractos de WBC.
- 60 La Figura 13 muestra la señal de BCR-ABL total en células K562 fijadas con extractos de WBC después de la retirada del BCR libre usando perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR. En particular, la Figura 13A muestra que la señal de BCR libre está saturada cuando los extractos de células K562 se fijaron con extractos de WBC. Después de tratamiento con perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR, la BCR libre se retiró. La Figura 13B muestra que la señal de BCR-ABL no cambiaba con el tratamiento con o sin perlas en el mismo experimento.
- 65

La Figura 14 muestra que el inhibidor de BCR-ABL imatinib (Gleevec®) inhibía de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, fosforilación), pero no la expresión (es decir, niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562.

5 La Figura 15 muestra que el inhibidor de BCR-ABL nilotinib (Tasigna®) inhibía de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, fosforilación), pero no la expresión (es decir, niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562.

10 La Figura 16 muestra que el inhibidor de BCR-ABL dasatinib (Sprycel®) inhibía de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, fosforilación), pero no la expresión (es decir, niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562.

La Figura 17 muestra que CRKL está tanto presente como activado (es decir, fosforilado) en células K562.

15 La Figura 18 muestra que CRKL está presente en células de carcinoma epidermoide humano en A431 y está activado (es decir, fosforilado) después del tratamiento con EGF.

La Figura 19 muestra que CRKL está presente en células de tumor epitelial de mama ductal humano T47D pero no está activado (es decir, fosforilado) después del tratamiento con EGF.

20 La Figura 20 muestra que CRKL está presente en células T47D y está activado (es decir, fosforilado) a niveles bajos después del tratamiento con heregulina (HRG).

25 La Figura 21 muestra que CRKL está presente en células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 y está activado (es decir, fosforilado) a niveles bajos después del tratamiento con heregulina (HRG).

La Figura 22 ilustra la presencia de CRKL activado (es decir, fosforilado) en los glóbulos blancos (WBC) de diferentes donantes.

30 La Figura 23 ilustra que JAK2 está activado (es decir, fosforilado) en células K562 y en células A431.

La Figura 24 ilustra que el BCR-ABL fosforilado se puede detectar y medir en lisados celulares preparados a partir de células K562 aisladas de sangre usando perlas magnéticas anti-CD45.

35 La Figura 25 ilustra que los niveles de BCR-ABL total no cambiaban cuando un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la BCR nativa de longitud completa (cuyo dominio C-terminal no está presente en BCR-ABL) se aplicaba puntualmente en la misma lámina en el mismo lecho que un anticuerpo dirigido contra la región N-terminal de BCR-ABL.

40 La Figura 26 ilustra que la señal de BCR nativo libre detectada con un anticuerpo de BCR específico para extremo N-terminal se reducía cuando un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal del BCR nativo se aplicaba puntualmente en la misma lámina en el mismo lecho.

Descripción detallada de la invención

45 I. Introducción

Las neoplasias hematológicas son los tipos de cáncer que afectan a la sangre, médula ósea y ganglios linfáticos. Dado que los tres están íntimamente conectados a través del sistema inmunológico, una enfermedad que afecte a uno de los tres a menudo también afectará a los demás. Por ejemplo, aunque técnicamente el linfoma es una enfermedad de los ganglios linfáticos, a menudo se extiende a la médula ósea y la sangre. Las translocaciones cromosómicas, que crean proteínas de fusión que tienen nuevas secuencias codificantes que contienen partes de las secuencias codificantes de dos genes diferentes, son una causa común de estas enfermedades, pero son una causa menos común de tumores sólidos. Como tal, es importante identificar la presencia y largo actividad de las proteínas de fusión oncogénicas asociadas a neoplasias malignas hematológicas para proporcionar el pronóstico y el tratamiento adecuados para los pacientes con estos tipos de cáncer.

Por ejemplo, la proteína de fusión BCR-ABL está asociada con la leucemia mielógena crónica (CML) así como con la leucemia linfoblástica aguda (ALL). En particular, la proteína BCR-ABL es una tirosina quinasa activa que es fundamental para la patogénesis del cáncer. Aunque en la actualidad el imatinib (Gleevec®) actualmente la terapia de primera línea para pacientes recién diagnosticados con CML, aproximadamente un 20-25 % de los pacientes no consiguen respuestas citogenéticas completas duraderas. Los estudios han mostrado que la reactivación de la actividad de la BCR-ABL quinasa en presencia del tratamiento continuado con imatinib es la principal causa de resistencia. Como tal, la medición de la actividad de BCR-ABL encuentra utilidad en la predicción de la respuesta a la terapia con inhibidores de tirosina quinasa tales como el imatinib así como en la identificación de pacientes que desarrollan resistencia a los inhibidores de este tipo.

La presente invención proporciona métodos para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de una o una pluralidad de proteínas de fusión (solos o en combinación con una o una pluralidad de moléculas de transducción de señales) en células aisladas usan un sistema de ensayo de basada en anticuerpo. Los extractos celulares preparados a partir de leucocitos aislados, células en circulación, u otros tipos de células son particularmente útiles en los métodos que se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, los inmunoensayos de alto rendimiento, multiplexados de la presente invención pueden detectar el estado de activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales a nivel de una sola célula. De hecho, se pueden detectar moléculas de transducción de señales tales como EGFR con una sensibilidad de aproximadamente 100 zeptomoles y un intervalo dinámico lineal de aproximadamente 100 zeptomoles a aproximadamente 100 femtomoles. Como tal, la detección del estado de activación de una sola célula de una o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales facilita el pronóstico y el diagnóstico del cáncer, así como el diseño de terapias personalizadas y dirigidas.

La Figura 1 ilustra un ensayo de detección doble de proximidad de la presente invención a modo de ejemplo en el que una proteína de fusión oncogénica tal como BCR-ABL se une a un anticuerpo de captura y a dos anticuerpos de detección (es decir, un anticuerpo independiente del estado de activación y un anticuerpo dependiente del estado de activación). El anticuerpo de captura **1** se une a la porción BCR de la proteína de fusión independiente de su estado de activación. Aunque el anticuerpo independiente del estado de activación **2** se une a la porción ABL de la proteína de fusión independiente de estado de activación, el anticuerpo dependiente del estado de activación **3** se une a la porción ABL de la proteína de fusión dependiente de su estado de activación (por ejemplo, el anticuerpo dependiente del estado de activación solamente se unirá a una forma activada de BCR-ABL que tiene un resto fosforilado). El anticuerpo independiente del estado de activación está etiquetado con un resto facilitador **4** ("Enzima A") y el anticuerpo dependiente del estado de activación está etiquetado con un primer miembro de un par de amplificación de señales **5** ("Enzima B"). La unión de ambos anticuerpos de detección a la porción ABL de la proteína de fusión pone al resto facilitador en la cercanía suficiente con respecto al primer miembro del par de amplificación de señales, dando como resultado la generación de una señal detectable y/o amplificable. En el presente documento se describen diversos métodos para canalización de proximidad que se conocen en la técnica incluyendo, pero no limitados a, FRET, fluorescencia resuelta en el tiempo-FRET, LOCI, etc.. Una ventaja de la canalización de proximidad, como se usa en los métodos de la presente invención, es que para esos análisis solamente se genera una sola señal detectable (por ejemplo, proteínas de fusión o moléculas de transducción de señales) que han unido los tres anticuerpos, dando como resultado un aumento de la especificidad del ensayo, fondo más bajo, y detección simplificada.

Como se explica con mayor detalle en el presente documento, para evaluar las terapias anticáncer potenciales para un paciente individual, las células aisladas se pueden incubar con uno o más fármacos anticáncer a dosis variables. A continuación se puede realizar estimulación con factor de crecimiento durante unos minutos (por ejemplo, aproximadamente 1-5 minutos) o durante varias horas (por ejemplo, aproximadamente 1-6 horas). La activación diferencial de las rutas de señalización con y sin fármacos anticáncer puede ayudar en la selección de una terapia para el cáncer adecuada a la dosis apropiada para cada paciente individual. Las células también se pueden aislar a partir un paciente durante el tratamiento con fármaco anticáncer y se pueden estimular con uno o más factores de crecimiento para determinar si podría implementar un cambio en la terapia. Como tal, la Figura 2 muestra que los métodos de la presente invención ayudan al profesional médico de forma ventajosa a proporcionar el fármaco anticáncer correcto a la dosis correcta en el momento correcto para cada paciente.

II. Definiciones

Como se usa en presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuye a menos que se especifique de otro modo.

El término "cáncer" incluye cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anómalas. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas conocidos, ya sea caracterizados como malignos, benignos, tejido blando, o sólidos, y cánceres en todos los estadios y grados incluyendo cánceres pre- y post-metastásicos. Los ejemplos no limitantes de diferentes tipos de cáncer incluyen neoplasias hematológicas (por ejemplo, leucemia, linfoma); sarcomas osteogénicos (por ejemplo, sarcoma de Ewing); sarcomas de tejido blando (por ejemplo, Dermatofibrosarcoma Protuberans (DFSP), rabdomiosarcoma); otras neoplasias de tejido blando, carcinomas tiroideos papilares; cáncer de próstata; cáncer gástrico (por ejemplo, estómago); cáncer de mama; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas); cánceres digestivos y gastrointestinales (por ejemplo, cáncer colorrectal, tumores del estroma gastrointestinal, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer de conductos biliares, y cáncer del intestino delgado); cáncer de esófago; cáncer de vesícula biliar; cáncer de hígado; cáncer pancreático; cáncer de apéndice; cáncer de ovario; cáncer renal (por ejemplo, carcinomas de células renales); cáncer del sistema nervioso central; cáncer de piel; coriocarcinomas; y cánceres de cabeza y cuello. Como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

Una "neoplasia hematológica" incluye cualquier tipo de cáncer que afecte a la sangre, médula ósea, y/o ganglios

linfáticos. Los ejemplos de neoplasias hematológicas incluyen, pero no se limitan a, leucemia, linfoma, y mieloma múltiple. Los ejemplos no limitantes de diferentes tipos de leucemia incluyen leucemia mielógena crónica (CML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena aguda (AML), y leucemia linfocítica granular de células grandes. Los subtipos de CML incluyen, por ejemplo, leucemia monocítica crónica. Los subtipos de ALL incluyen, por ejemplo, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B precursores, leucemia linfoblástica aguda de pro-linfocitos B precursores, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T precursores, y leucemia bifenotípica aguda. Los subtipos de CLL incluyen, por ejemplo, leucemia prolinfocítica de linfocitos B. Los subtipos de AML incluyen, por ejemplo, leucemia promielocítica aguda, leucemia mieloblástica aguda, y leucemia megacarioblástica aguda. Los ejemplos de diferentes tipos de linfoma incluyen, pero no se limitan a, linfoma de Hodgkin (cuatro subtipos) y linfoma no Hodgkin, tal como, por ejemplo, linfoma linfocítico de células pequeñas (SLL), linfoma de linfocitos B de células grandes y difusas (DLBCL), linfoma folicular (FL), linfoma de células del manto (MCL), leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de la zona marginal (MZL), linfoma de Burkitt (BL), trastorno linfoproliferativo post-trasplante (PTLD), leucemia prolinfocítica de linfocitos T (T-PLL), leucemia prolinfocítica de linfocitos B (B-PLL), macroglobulinemia de Waldenström (también conocida como linfoma linfoplasmacítico), y otros linfomas de células NK o linfocitos T.

El término "analito" incluye cualquier molécula de interés, por lo general una macromolécula tal como un polipéptido, cuya presencia, cantidad, identidad y/o se determina. En ciertos casos, el analito es un componente celular de una célula cancerosa, preferentemente una proteína de fusión oncogénica o una molécula de transducción de señales.

El término "transformar" o "transformante" incluye un cambio físico y/o químico de un analito o muestra para extraer el analito o para cambiar o modificar el analito como se define en el presente documento. Como se usa en el presente documento, una extracción, una manipulación, una precipitación química, un ELISA, una formación de complejos, una inmunoestracción, una modificación física o química del analito o muestra para medir un nivel o concentración o estado de activación de un analito, todos constituyen una transformación. En otras palabras, siempre y cuando el analito o muestra no sea idéntico antes y después de la etapa de transformación, el cambio o modificación es una transformación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "serie de dilución" pretende incluir una serie de concentraciones decrecientes de una muestra en particular (por ejemplo, lisado celular) o reactivo (por ejemplo, anticuerpo). Por lo general, una serie de dilución se produce mediante un proceso de mezcla de 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 las veces suficientes para obtener el número deseado de diluciones en serie. La muestra o reactivo se puede diluir 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 serie de dilución 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 decrecientes de la muestra o reactivo. Por ejemplo, una serie de dilución que comprende una dilución en serie de 2 veces de un reactivo de anticuerpo de captura a una concentración de partida de 1 mg/ml se puede producir mezclando una cantidad de la concentración de partida del 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 anticuerpos 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", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un ensayo para detectar un analito específico en tan solo una célula o en tanto como miles de células. Por ejemplo, los inmunoensayos que se describen en el presente documento poseen un intervalo dinámico superior porque detectan de forma ventajosa una proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales de interés de 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 serie de dilución de concentraciones de anticuerpos de captura.

La expresión "proteína de fusión" o "proteína quimérica" incluye una proteína creada a través de la unión de dos o más genes que originalmente codifican proteínas separadas. Las fusiones genéticas de este tipo se generan por lo general cuando una translocación cromosómica reemplaza los exones terminales de un gen con exones intactos de un segundo gen. Esto crea un solo gen que se puede transcribir, cortar y empalmar y traducir para producir una proteína de fusión funcional. En realizaciones en particular, la proteína de fusión es una proteína de fusión oncogénica, es decir, una proteína de fusión involucrada en la oncogénesis. Los ejemplos de proteínas de fusión oncogénicas incluyen, pero no se limitan a, BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RARa-PML, IREL-URG, CBFp-MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-Cα1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, y TPR-MET.

La expresión "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que realizan el proceso mediante el que una célula convierte una señal extracelular o un estímulo en una respuesta, por lo general implicando a secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas dentro de la célula. Los ejemplos de moléculas de transducción de señales incluyen, pero no se limitan a, tirosina quinasas receptoras tales como EGFR (por ejemplo, EGFR/HER-1/ErbB1, HER-2/Neu/ErbB2, HER-3/ErbB3, HER-4/ErbB4), VEGFR-1/FLT-1, VEGFR-

2/FLK-1/KDR, VEGFR-3/FLT-4, FLT-3/FLK-2, PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-Met, 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, MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-cadherina, LTK (tirosina quinasa leucocitaria), ALK (quinasa de linfoma anaplásico), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3, RTK 106, y formas truncadas de las tirosina quinasa receptoras tales como p95ErbB2; tirosina quinasa no receptoras tales como Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack, y LIMK; componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa tales como Akt, MAPK/ERK, MEK, RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc (p66), PI3K, Ras (por ejemplo, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p70 S6 quinasa, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, PIP2, PIP3, PDK, mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, PTEN, RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67, y paxilina; receptores de hormonas nucleares tales como receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de andrógenos, receptor de glucocorticoides, receptor de mineralocorticoides, receptor de vitamina A, receptor de vitamina D, receptor de retinoides, receptor de hormona tiroidea y receptores huérfanos; coactivadores y supresores de receptores nucleares; y combinaciones de los mismos.

El término "muestra" como se usa en el presente documento incluye cualquier muestra de ensayos biológica obtenida a partir de un paciente. Las muestras incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, plasma, suero, fluido de lavado ductal, aspiración a través 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, aspiración con aguja fina (por ejemplo, cosechadas mediante aspiración aleatoria con aguja fina periareolar), cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (por ejemplo, tejido tumoral) tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo, biopsia con aguja) o un ganglio linfático (por ejemplo, biopsia del ganglio linfático centinela), y extractos celulares de los mismos. En algunas realizaciones, la muestra es sangre completa o un componente fraccionario de la misma tal como plasma, suero, glóbulos rojos, leucocitos tales como células mononucleares de sangre periférica, y/o células en circulación raras. En realizaciones en particular, la muestra se obtiene aislando leucocitos o células en circulación de un tumor sólido a partir de sangre completa o una fracción celular de la misma usando cualquier técnica conocida en la técnica. En otras realizaciones, la muestra es una muestra de tejido tumoral embebida en parafina fijada con formalina (FFPE), por ejemplo, de un tumor sólido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "células en circulación" comprende células extratumorales que se han metastatizado o micrometastatizado a partir de un tumor sólido. Los ejemplos de células en circulación incluyen, pero no se limitan a, células tumorales en circulación, células madre cancerosas, y/o células que están migrando al tumor (por ejemplo, células precursoras endoteliales en circulación, células endoteliales en circulación, células mieloides pro-angiogénicas en circulación, células dendríticas en circulación, etc).

Una "biopsia" se refiere al proceso de extracción de una muestra de tejido para evaluación de diagnóstico o pronóstico, y a la muestra de ensayo del propio tejido. Cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica se puede aplicar a los métodos y composiciones de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá, en general, del tipo de tejido que se va a evaluar y del tamaño y tipo del tumor (es decir, sólido o suspendido (es decir, sangre o ascitis)), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen biopsia escisional, biopsia incisional, biopsia con aguja, biopsia por aspiración con aguja fina, etc.), biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Las técnicas de biopsia se discuten, 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 observará que se pueden realizar técnicas de biopsia para identificar células cancerosas y/o precancerosas en una muestra de tejido dada.

La expresión "sujeto" o "paciente" o "individuo" por lo general incluye seres humanos, pero también puede incluir otros animales tales como, por ejemplo, otros primates, roedores, caninos, felinos, equinos, ovinos, porcinos y similares.

Una "matriz" o "micromatriz" comprende un conjunto o serie de dilución distintos de anticuerpos de captura inmovilizados o sujetos en un soporte sólido tal como, por ejemplo, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, pasadores, filtros, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, poliestireno perlas, etc), papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc), haces de fibra, o cualquier otro sustrato adecuado. Los anticuerpos de captura por lo general están inmovilizados o sujetos en el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En ciertos casos, los anticuerpos de captura comprenden etiquetas de captura que interactúan con los agentes de captura unidos al soporte sólido. Las matrices usadas en los ensayos de la presente invención por lo general comprenden una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes y/o concentraciones de anticuerpo de captura que están acoplados a la superficie de un soporte sólido en localizaciones conocidas/direccionables diferentes.

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 de leucocitos o circulación en circulación raras. En realizaciones preferentes, el anticuerpo de captura está sujeto en un soporte sólido en una matriz. Los anticuerpos de captura adecuados para inmovilizar cualquiera de una diversidad de proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales en un soporte sólido están

disponibles en 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).

5 La expresión "anticuerpo de detección" como se usa en el presente documento incluye un anticuerpo que comprende una etiqueta detectable que es específica para (es decir, se une, está unida por, o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra. La expresión también incluye un anticuerpo que es específico para uno o más analitos de interés, en el que el anticuerpo puede estar unido por otra especie que comprenda una etiqueta detectable. Los ejemplos de etiquetas detectables incluyen, pero no se limitan a, etiquetas de biotina/estreptavidina, etiquetas de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido), etiquetas químicamente reactivas, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas, etiquetas radiactivas, y combinaciones de las mismas. Los anticuerpos de detección adecuados para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquier de una diversidad de proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales están disponibles en 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 un ejemplo no limitante, los anticuerpos específicos de fosfo 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 miles en Santa Cruz Biotechnology.

20 La expresión "anticuerpo dependiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico para (es decir, se une, está unido por, o forma un complejo con) un determinado estado de activación de uno o más analitos de interés en una muestra. En realizaciones preferentes, el anticuerpo dependiente del estado de activación detecta la fosforilación, ubiquitinación, y/o el estado de formación de complejos de uno o más analitos como una o más proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales. En algunas realizaciones, la fosforilación del dominio de ABL quinasa de la proteína de fusión BCR-ABL se detecta usando un anticuerpo dependiente del estado de activación. En otras realizaciones, la fosforilación de miembros de la familia EGFR de tirosina quinasas receptoras y/o la formación de complejos heterodiméricos entre miembros de la familia EGFR se detecta usando anticuerpos dependientes del estado de activación.

30 Los ejemplos no limitantes de estados de activación de las proteínas de fusión oncogénicas que son adecuados para detección con anticuerpos dependientes del estado de activación incluyen formas fosforiladas de BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RARa-PML, IREL-URG, CBF β -MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-C α 1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, y TPR-MET. Los ejemplos de estados de activación (enumerados entre paréntesis) de moléculas de transducción de señales que son adecuadas para detección con anticuerpos dependientes del estado de activación incluyen, pero no se limitan a, EGFR (EGFRVIII, (p-) EGFR fosforilado, EGFR:Shc, (u-) EGFR ubiquitinado, p-EGFRVIII); ErbB2 (p95:(Tr)-ErbB2 truncado, p-ErbB2, p95:Tr-p-ErbB2, HER-2: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 complejo de (p-c-Met o c-Met/HGF), ER (pER (S118, S167)); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); KIT (p-KIT); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRa (p-PDGFRa); PDGFRP (p-PDGFRP); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLCg, VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLCy, 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); NFKB y/o IKK (p-IK (S32), p-NFKB (S536), p-P65:IKBa); Akt (p-Akt (T308, S473)); PTEN (p-PTEN); Bad (p-Bad (S112, S136), Bad:14-3-3); mTor (p-mTor (S2448)); p70S6K (p-p70S6K (T229, T389)); Mek (p-Mek (S217, S221)); Erk (p-Erk (T202, Y204)); Rsk-1 (p-Rsk-1 (T357, S363)); Jnk (p-Jnk (T183, Y185)); P38 (p-P38 (T180, Y182)); Stat3 (p-Stat-3 (Y705, S727)); Fak (p-Fak (Y576)); Rb (p-Rb (S249, T252, S780)); Ki67; p53 (p-p53 (S392, S20)); CREB (p-CREB (S133)); c-Jun (p-c-Jun (S63)); cSrc (p-cSrc (Y416)); y paxilina (p-paxilina (Y118)).

50 La expresión "anticuerpo independiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico para (es decir, se une, está unido por, 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 proteínas de fusión oncogénicas o moléculas de transducción de señales.

60 La expresión "ácido nucleico" o "polinucleótido" incluye desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de una sola hebra o de doble hebra tal como, por ejemplo, ADN y ARN. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la estructura principal modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen natural, y que tienen propiedades de unión similares como el ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de los análogos de este tipo incluyen, pero no se limitan a, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos y péptido-ácidos nucleicos (PNA). A menos que esté limitada de forma específica, la expresión incluye ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como el ácido nucleico de referencia. Una secuencia de ácidos nucleicos en particular también incluye de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma y secuencias complementarias, así como la

secuencia indicada de forma explícita.

La expresión "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de una sola hebra de ARN, ADN, híbrido de ARN/ADN, y/o un mimético de los mismos. En ciertos casos, los oligonucleótidos se componen de nucleobases, azúcares y enlaces internucleósidos (estructura principal) de origen natural (es decir, no modificados). En otros casos determinados, los oligonucleótidos comprenden nucleobases, azúcares, y/o enlaces internucleósidos modificados.

Como se usa en el presente documento, la expresión "motivo de falta de coincidencias" o "región de falta de coincidencias" se refiere a una porción de un oligonucleótido que no tiene un 100 % de complementariedad con su secuencia complementaria. Un oligonucleótido puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más regiones de falta de coincidencias. Las regiones de falta de coincidencias 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 de falta de coincidencias pueden comprender un solo nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco, o más nucleótidos.

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a unas condiciones bajo las cuales un oligonucleótido se hibridará con su secuencia complementaria, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan de forma específica a temperaturas más altas. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra 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). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de nucleótidos definidos) a la que un 50 % de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (dado que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , un 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces el fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo.

Las expresiones "sustancialmente idénticos" 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 que tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que es el mismo (es decir, al menos aproximadamente un 60 %, preferentemente al menos aproximadamente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % de identidad sobre una región especificada) cuando se comparan y se alinean para correspondencia máxima con respecto a una ventana de comparación o región designada tal como se mire usando un algoritmo de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Esta definición, cuando el contexto lo indica, también se refiere de forma análoga al complemento de una secuencia. Preferentemente, la identidad sustancial existe sobre una región que tiene una longitud de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos.

La expresión "inhibidor de tirosina quinasa" incluye cualquiera de una diversidad de agentes terapéuticos o fármacos que actúan como inhibidores selectivos o no selectivos de tirosina quinasa receptoras y/o no receptoras. Sin quedar ligado a ninguna teoría en particular, los inhibidores de tirosina quinasa por lo general inhiben tirosina quinasa diana mediante la unión al sitio de unión a ATP de la enzima. Los ejemplos de inhibidores de tirosina quinasa incluyen, pero no se limitan a, imatinib (Gleevec[®]; STI571), nilotinib (Tasigna[®]), dasatinib (Sprycel[®]), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]; SU11248), erlotinib (Tarceva[®]; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos. Los inhibidores de tirosina quinasa adicionales adecuados para su uso en la presente invención se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos n.ºs 5.618.829, 5.639.757, 5.728.868, 5.804.396, 6.100.254, 6.127.374, 6.245.759, 6.306.874, 6.313.138, 6.316.444, 6.329.380, 6.344.459, 6.420.382, 6.479.512, 6.498.165, 6.544.988, 6.562.818, 6.586.423, 6.586.424, 6.740.665, 6.794.393, 6.875.767, 6.927.293, y 6.958.340. Alguien con experiencia en la materia conocer a otros inhibidores de tirosina quinasa adecuados para su uso en la presente invención. En ciertos casos, el inhibidor de tirosina quinasa se administra en una forma farmacéuticamente aceptable que incluye, pero no se limita a, una sal de metal alcalino o alcalinotérreo tal como una sal de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, o cinc; una sal de amonio tal como una sal de amina terciaria o amonio cuaternario; y una sal de ácido tal como una sal de succinato, tartrato, bitartrato, diclorhidrato, salicilato, hemisuccinato, citrato, isocitrato, malato, maleato, mesilato, clorhidrato, bromhidrato, fosfato, acetato, carbamato, sulfato, nitrato, formiato, lactato, gluconato, glucuronato, piruvato, oxalacetato, fumarato, propionato, aspartato, glutamato, o benzoato.

La expresión "incubar" se usa de manera sinónimo con "poner en contacto" y "exponer" y no implica ningún requisito específico de tiempo o temperatura a menos que se indique de otro modo.

Las expresiones "respuesta citogenética completa", "remisión citogenética completa", "CCyR" y "CCgR" incluyen los criterios aceptados clínicamente definidos como la ausencia de células positivas para el cromosoma Filadelfia en metafase entre una población de al menos 20 células en metafase, tal como se determina mediante la formación de

- bandas de cromosomas de células aisladas de la médula ósea. En ciertos casos, cuando las células en metafase aisladas de la médula ósea no se pueden obtener o evaluar mediante formación de bandas de cromosomas, la expresión se puede definir como la presencia de < 1 % de núcleos positivos de BCR-ABL a partir de al -200 núcleos puntuados como se determina mediante hibridación *in situ* de fluorescencia interfase (FISH) de células sanguíneas.
- 5 La FISH de interfase se puede realizar, por ejemplo, con extraseñal de BCR-ABL, color doble, fusión doble, o sondas de hibridación *in situ*. Para descripciones adicionales de estos términos, véase, por ejemplo, O'Brien *et al.*, N. Engl. J. Med., 348: 994-1004 (2003); Hughes *et al.*, N. Engl. J. Med., 349: 1423-1432 (2003); y Bacarani *et al.*, J. Clin. Oncol., 27: 6041-6051 (2009).
- 10 Una "respuesta molecular principal", "remisión molecular principal" o "MMR" se consigue cuando el nivel de una proteína de fusión oncogénica tal como BCR-ABL disminuye en al menos aproximadamente 2-3 logs con respecto a uno o más niveles de proteína de control tales como BCR de longitud completa y/o ABL de longitud completa. En ciertas realizaciones, una respuesta molecular importante se consigue cuando la proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, niveles de BCR-ABL) con respecto a los niveles de proteína de control
- 15 (por ejemplo, niveles de BCR o ABL) durante la terapia con el fármaco anticáncer (por ejemplo, inhibidor de tirosina quinasa) se reduce en al menos aproximadamente 2-3 logs con respecto a la proporción de las mismas proteínas antes de la terapia con el fármaco anticáncer. A diferencia de las definiciones de la respuesta molecular principal que dependen de la detección de los niveles de transcripción del ARNm, los ensayos de detección doble de proximidad basados en anticuerpo de la presente invención de forma ventajosa proporcionan la capacidad de detectar una
- 20 célula cancerosa (por ejemplo, CML) en el fondo de aproximadamente 100.000 células de un donante sano, permitiendo de este modo la determinación de una respuesta molecular importante midiendo y comparando los niveles de proteína BCR-ABL, BCR, y/o ABL. En otras realizaciones, una respuesta molecular importante es una clasificación clínica definida como una reducción de al menos 3 logs por debajo de un valor estandarizado de una medida inicial en una escala logarítmica (base 10) en la proporción de transcripciones de ARNm de BCR-ABL con
- 25 respecto a cualquiera de transcripciones de ARNm de ABL o BCR expresado como un porcentaje de niveles de transcripciones de ARNm de ABL o BCR. En ciertos casos, el nivel de transcripciones de ARNm se determina usando métodos de usando RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). En otras realizaciones, una respuesta molecular importante es la condición cuando se determina que la proporción de BCR-ABL con respecto a transcripciones de ARNm de ABL, BCR o de control se determina mediante qPCR es un valor que se define como
- 30 < 0,1 % en la escala internacional (IS). La IS está vinculada con la escala de reducción log establecida por los laboratorios participantes en el Estudio Aleatorio Internacional de Interferón con respecto al estudio clínico de STI571 (IRIS). Véase, por ejemplo, Hughes *et al.*, N. Engl. J. Med., 349: 1423-1432 (2003); Hughes *et al.*, Blood, 108: 28-37 (2006), Brand *et al.*, Blood, 112: 3330-3338 (2008); y Bacarani *et al.*, J. Clin. Oncol., 27: 6041-6051 (2009).
- 35 Una "respuesta molecular completa", "remisión molecular completa" o "CMR" se consigue cuando el nivel de una proteína de fusión oncogénica tal como BCR-ABL disminuye en al menos aproximadamente 3-4 logs con respecto a uno o más niveles de proteína de control tal como BCR de longitud completa y/o ABL de longitud completa. En ciertas realizaciones, una respuesta molecular completa se consigue cuando la proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, niveles de BCR-ABL) con respecto a los niveles de proteína de control (por
- 40 ejemplo, niveles de BCR o ABL) durante la terapia con el fármaco anticáncer se reduce en al menos aproximadamente 3-4 logs con respecto a la proporción de las mismas proteínas antes de la terapia con el fármaco anticáncer (por ejemplo, inhibidor de tirosina quinasa). A diferencia de las definiciones de la respuesta molecular completa que dependen de la detección de niveles de transcripción de ARNm, los ensayos de detección doble de proximidad basados en anticuerpo de la presente invención de forma ventajosa proporcionan la capacidad de
- 45 detectar una célula cancerosa (por ejemplo, CML) en el fondo de aproximadamente 1.000.000 células de un donante sano, permitiendo de ese modo la determinación de una respuesta molecular completa midiendo y comparando los niveles de proteína BCR-ABL, BCR, y/o ABL. En otras realizaciones, una respuesta molecular completa es una clasificación clínica en la que las transcripciones de ARNm de BCR-ABL son indetectables por qPCR y/o PCR anidada en al menos dos muestras de sangre consecutivas de calidad adecuada como para asegurar la capacidad
- 50 para detectar una disminución de 4,0-4,5 log en los niveles de ARNm de BCR-ABL. En ciertos casos, una respuesta molecular completa se puede definir como una reducción de al menos 4,5 logs por debajo de un valor de medida inicial estandarizada en una escala logarítmica en la proporción de BCR-ABL con respecto a transcripciones de ARNm de ABL, BCR o de control expresado como un porcentaje. Véase, por ejemplo, Press *et al.*, Blood, 107: 4250-4256 (2006); Muller *et al.*, Leukemia., 23: 1957-1963 (2009); y Bacarani *et al.*, J. Clin. Oncol., 27: 6041-6051 (2009).
- 55 La expresión "ciclo de terapia" incluye cualquier enfoque terapéutico tomado para aliviar o prevenir uno o más síntomas asociados con un cáncer tal como una neoplasia hematológica (por ejemplo, leucemia, linfoma, etc). El término incluye la administración de cualquier compuesto, fármaco, procedimiento, y/o régimen útil para mejorar la salud de un individuo con cáncer e incluye cualquiera de los agentes terapéuticos que se describen en el presente
- 60 documento. Un experto en la materia observará que cualquiera del ciclo de terapia o la dosis del ciclo de terapia actual puede cambiar (por ejemplo, aumentar o disminuir) basándose en los niveles de expresión y/o activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales determinados usando los métodos de la presente invención.

III. Descripción de las Realizaciones

La presente invención proporciona matrices basadas en anticuerpo para detectar el estado de activación y/o cantidad total de una o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales en una muestra biológica tal como un extracto o lisado celular. La presente invención también proporciona métodos para usar las matrices de este tipo para facilitar el pronóstico y diagnóstico del cáncer, la predicción o identificación de resistencia al tratamiento con fármacos, y el diseño de terapias dirigidas, personalizadas. En realizaciones en particular, las composiciones y métodos de la presente invención de forma ventajosa identifican pacientes que son resistentes a la terapia con un inhibidor de tirosina quinasa tal como imatinib debido a mutaciones en la proteína quinasa diana (por ejemplo, BCR-ABL), incumplimiento del régimen terapéutico, y/o administración de una dosis de fármaco subóptima.

En una realización en particular, la presente invención proporciona ensayos tales como, por ejemplo, inmunoensayos, para la detección en tiempo real del nivel de expresión y/o el grado de activación (por ejemplo, fosforilación) de BCR-ABL, sustratos de la misma, y/u otras moléculas de transducción de señales en una muestra biológica tal como un extracto o lisado celular. Como tal, la presente invención de forma ventajosa proporciona beneficios a los pacientes con neoplasias hematológicas tales como CML que están recibiendo una o más terapias dirigidas mediante identificación sistemática y supervisión de los mismos durante el ciclo de terapia y evaluando si se deberían cambiar a una terapia dirigida alternativa tal como, por ejemplo, nilotinib (Tasigna[®]), para inhibir de forma eficaz la molécula diana (por ejemplo, BCR-ABL) con una toxicidad mínima.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un método que tiene un intervalo de sensibilidad superior a la detección de las proteínas de fusión oncogénicas tales como BCR-ABL. Los inmunoensayos actuales para detectar proteínas BCR-ABL en extractos celulares pueden detectar por lo general una células de leucemia positiva para BCR-ABL en 10-100.000 células normales, equivalente a una sensibilidad de detección de un 10-0,001 % (véase, por ejemplo, Jilani *et al.*, *Leuk. Res.*, 32: 936-943 (2008); Weerkamp *et al.*, *Leukemia*, 23: 1106-1117 (2009); Raponi *et al.*, *Haematologica*, 94: 1767-1770 (2009); y en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos con n.º US 2006/0172345). Los ensayos de proximidad que se describen en el presente documento presentan de forma ventajosa un aumento de la sensibilidad a aproximadamente 1:100,000-10,000.000 células (es decir, una célula de leucemia con respecto a aproximadamente 100,000-10,000.000 células normales; equivalente a una sensibilidad de detección de aproximadamente un 0,001-0,00001 %) o aproximadamente 1:1.000.000-10,000.000 células (es decir, una célula de leucemia con respecto a aproximadamente 1.000.000-10.000.000 de células normales; equivalente a una sensibilidad de detección de aproximadamente 0,0001-0,00001 %), e incluyen, por ejemplo, aproximadamente 1:100.000 células, 1:200.000 células, 1:300.000 células, 1:400.000 células, 1:500.000 células, 1:600.000 células, 1:700.000 células, 1:800.000 células, 1:900.000 células, 1:1.000.000 células, 1:2.000.000 células, 1:3.000.000 células, 1:4.000.000 células, 1:5.000.000 células, 1:6.000.000 células, 1:7.000.000 células, 1:8.000.000 células, 1:9.000.000 células, 1:10.000.000 células, 1:100.000-500.000 células, 1:100.000-1.000.000 células, 1:500.000-1.000.000 células, 1:100.000-5.000.000 células, 1:500.000-10.000.000 células, 1:2.000.000-10.000.000 células, 1:5.000.000-10.000.000 células, 1:1.000.000-7,500.000 células, 1:1.000.000-5.000.000 células, y cualquier otro intervalo en los mismos. La sensibilidad de los métodos que se describen en el presente documento se puede comparar con o puede superar a la de los ensayos convencionales de BCR-ABL basados en ácido nucleico (por ejemplo, qPCR o PCR anidada), que entra dentro del intervalo de detección de 1 células de leucemia con respecto a 10.000-1.000.000 células normales. Para descripciones adicionales del intervalo de sensibilidad de ensayos de BCR-ABL basados en ácido nucleico, véase, por ejemplo, Press *et al.*, *Blood*, 107: 4250-4256 (2006) y Radish JP, *Blood*, 114: 3376-3381 (2009).

En realizaciones en particular, los ensayos de proximidad basados en anticuerpo de la presente invención de forma ventajosa permiten un grado más elevado de sensibilidad y/o especificidad para detectar la presencia, nivel, y/o estado de activación de proteínas de fusión oncogénicas tales como BCR-ABL en comparación con los inmunoensayos actuales y ensayos basados en ácidos nucleicos para detectar BCR-ABL, proporcionando de ese modo una determinación más precisa de indicadores de respuestas tales como, por ejemplo, una respuesta citogenética completa, una respuesta molecular importante, una respuesta molecular completa, y combinaciones de los mismos. Como un ejemplo no limitante, los ensayos actuales basados en ácidos nucleicos no son lo suficientemente sensibles como para detectar cantidades muy bajas de transcripciones de BCR-ABL en una muestra de un paciente, de modo que una determinación de una respuesta molecular completa usando los ensayos actuales basados en ácidos nucleicos no necesariamente significa que el paciente esté curado y que ya no tenga la enfermedad mediada por BCR-ABL (por ejemplo, CML).

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar el nivel o estado de activación de una proteína de fusión oncogénica, método que comprende:

- (a) poner en contacto un extracto celular con un primer resto de unión específico para un primer dominio de una primera proteína de longitud completa en condiciones adecuadas para transformar la primera proteína de longitud completa presente en el extracto celular en un complejo que comprende la primera proteína de longitud completa y el primer resto de unión, en el que el primer dominio de la primera proteína de longitud completa está

ausente de una proteína de fusión oncogénica correspondiente que comprende un segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa fusionado a un primer dominio de una segunda proteína de longitud completa diferente;

(b) retirar el complejo de la etapa (a) del extracto celular para formar un extracto celular desprovisto de la primera proteína de longitud completa;

(c) poner en contacto el extracto celular de la etapa (b) con un segundo resto de unión específico para el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa en condiciones adecuadas para transformar la proteína de fusión oncogénica presente en el extracto celular en un complejo que comprende la proteína de fusión oncogénica y el segundo resto de unión; y

(d) determinar el nivel o estado de activación del complejo de la etapa (c), determinando de ese modo el nivel o estado de activación de la proteína de fusión oncogénica.

En una realización, el extracto celular comprende un extracto de células aisladas de una muestra. En ciertos casos, la muestra se selecciona entre sangre completa, suero, plasma, aspiración con aguja fina (FNA), orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspiración a través del pezón, linfa, saliva, y combinaciones de los mismos. En otra realización, la muestra se obtiene a partir de un paciente con cáncer. En algunos casos, el cáncer puede estar causado por la formación de una proteína de fusión oncogénica debido a una translocación cromosómica en las células cancerosas. Los ejemplos de los cánceres de este tipo incluyen, pero no se limitan a, una neoplasia hematológica, un sarcoma osteogénico, un sarcoma de tejido blando, y combinaciones de los mismos. En realizaciones en particular, la neoplasia hematológica es una leucemia o linfoma. En una realización preferente, la leucemia es leucemia mielógena crónica (CML). En otra realización, las células aisladas a partir de las que se prepara el extracto o lisado celular pueden comprender células tumorales en circulación, leucocitos, o combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento. En algunos casos, las células aisladas se incuban con un fármaco anticáncer antes de la estimulación con factor de crecimiento. En otros casos, las células aisladas se lisan después de la estimulación con factor de crecimiento para producir el extracto celular.

En algunas realizaciones, el extracto celular se prepara a partir de muestras de médula ósea o sangre completa recién recogidas o congeladas. Como un ejemplo no limitante, una muestra de sangre completa tratada con anticoagulantes (por ejemplo, EDTA, heparina y/o ácido-citrato-dextrosa (ACD)) se separa primero en una fracción de plasma o suero y una fracción celular. La fracción celular se puede procesar mediante lisis hipotónica de glóbulos rojos con cloruro de amonio y/o centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-HyPaque para aislar los leucocitos de una muestra de sangre. Las células aisladas presentes en la fracción celular se pueden lisar para transformar de ese modo las células aisladas en un extracto celular mediante cualquier técnica conocida en la técnica, tal como las que se describen en Raponi *et al.*, *Leuk Res*, 32: 923-43 (2008); Weerkamp *et al.*, *Leukemia*, 23: 1106-1117 (2009); y documentos de Patente de Estados Unidos n.º 6.610.498 y 6.686.165.

En algunos casos, los leucocitos aislados se pueden tratar con uno o más inhibidores de proteasa permeables a la célula antes de la lisis. Los inhibidores de proteasa permeables a la célula incluyen, pero no se limitan a, fluorofosfato de diisopropilo (DFP), clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonilo (AEBSF), fluoruro de fenilmetanosulfonilo (PMSF) y mezclas de los mismos. Como un ejemplo no limitante, los leucocitos aislados se incuban durante 10-30 min en hielo en un tampón que contiene AEBSF 20 mM y PMSF 1 mM en PBS. Las células se centrifugan suavemente durante 5 min a 520 g a 4 °C para separar el sobrenadante y los leucocitos aislados. El tratamiento de los leucocitos aislados con inhibidores de proteasa se describe, por ejemplo, en Weerkamp *et al.*, *Leukemia*, 23: 1106-1117 (2009).

En algunos casos, los leucocitos aislados se pueden incubar hasta 30 min en hielo en tampón de lisis de RIPA que contiene uno o más inhibidores de proteasa. El tampón de RIPA esencialmente comprende o consiste en Tris HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NP40 al 1 %, y dodecil sulfato sódico al 0,1 %. En otros casos determinados, el tampón de RIPA no contiene desoxicolato sódico. Después de la intubación, la mezcla celular se centrifuga a ≥ 18.000 g durante 1-10 minutos a 4 °C para separar el extracto celular y el residuo celular. El extracto celular se recoge. Para descripciones adicionales de protocolos de lisis celular, véase, por ejemplo, Raponi *et al.*, *Haematologica*, 94: 1767-1770 (2009); Weerkamp *et al.*, *Leukemia*, 23: 1106-1117 (2009); y en el documento de Patente de Estados Unidos con n.º US 2006/0172345.

En algunas realizaciones, el plasma se prepara a partir de muestras de sangre periférica completa recién obtenida recogidas y tratadas con uno o más anticoagulantes (por ejemplo, EDTA, heparina o ACD), tal como se describe en Jilani *et al.*, *Leuk. Res.*, 32: 936-943 (2008). Como un ejemplo no limitante, las muestras de sangre se pueden separar en una fracción de plasma o suero y una fracción celular. El plasma se puede almacenar a -70-80 °C hasta que se somete a ensayo o se somete a ensayo dentro de las 96 horas de la recogida de la muestra de sangre.

En ciertas realizaciones, la proteína de fusión oncogénica se selecciona entre el grupo que consiste en BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RARa-PML, IREL-URG, CBF3-MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-Ca1, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET, y combinaciones de los mismos. En realizaciones en particular, la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL. En ciertos casos, la primera proteína de

- longitud completa es BCR, el primer dominio de la primera proteína de longitud completa comprende la región carboxilo-terminal de BCR (BCR-C), y el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa comprende la región amino-terminal de BCR (BCR-N). En otros casos determinados, la segunda proteína de longitud completa diferente es ABL, el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente comprende la
- 5 región carboxilo-terminal de ABL (ABL-C), y el segundo dominio, diferente de la segunda proteína de longitud completa diferente comprende la región amino-terminal de ABL (ABL-N). En una realización alternativa, la primera proteína de longitud completa es ABL y la segunda proteína de longitud completa diferente es BCR.
- En algunas realizaciones, el estado de activación se selecciona entre el grupo que consiste en un estado de fosforilación, estado de ubiquitinación, estado de formación de complejos, y combinaciones de los mismos. En una
- 10 realización preferente, la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL y el estado de activación es un estado de fosforilación.
- En otras realizaciones, los métodos de ensayo de la presente invención comprenden adicionalmente determinar el nivel o estado de activación de una o más moléculas de transducción de señales. En realizaciones en particular, la
- 15 una o más moléculas de transducción de señales comprende un sustrato de BCR-ABL tal como, por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1, y combinaciones de los mismos.
- En una realización en particular, el primer resto de unión comprende un primer anticuerpo. En algunos casos, el
- 20 primer anticuerpo está unido a un soporte sólido. Los ejemplos no limitantes de soporte sólidos incluyen vidrio, plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibra, y combinaciones de los mismos. En realizaciones preferentes, el primer anticuerpo está unido a una perla (por ejemplo, perla magnética, perla de poliestireno, *etc.*), y la perla funciona como una etiqueta de disminución para retirar la primera proteína de longitud completa del extracto celular.
- 25 En otra realización particular, el segundo resto de unión comprende un segundo anticuerpo. En algunos casos, el primer anticuerpo está unido a un soporte sólido. Los ejemplos no limitantes de soporte sólidos incluyen vidrio, plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibra, y combinaciones de los mismos. En una realización preferente, el segundo anticuerpo está sujeto en un soporte sólido tal como una membrana (por ejemplo,
- 30 nailon, nitrocelulosa, PVDF, *etc.*) en una matriz direccionable. En otra realización, el segundo anticuerpo está unido a una perla (por ejemplo, perla magnética, perla de poliestireno, *etc.*), en el que la perla puede contener opcionalmente un colorante tal como un fluoróforo (por ejemplo, una perla coloreada). En los casos en los que se usa una pluralidad de perlas, cada perla puede contener un colorante seleccionado independientemente tal como un fluoróforo (por ejemplo, un fluoróforo rojo o infrarrojo) de diferentes intensidades o con diferentes espectros de
- 35 excitación y/o emisión.
- En realizaciones preferentes, las etapas (c) y (d) comprenden un ensayo de detección doble de proximidad (también conocido como Ensayo de Inmuno Proximidad Colaborativa (Collaborative Proximity Immuno Assay) "COPIA") como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, las etapas (c) y (d) comprenden un ensayo de
- 40 inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA), un ensayo de citometría de flujo, o un ensayo de clasificación de etiquetas como se describe en el presente documento.
- En realizaciones en las que las etapas (c) y (d) comprenden un ensayo de detección doble de proximidad, la etapa (c) puede comprender adicionalmente:
- 45 (c') poner en contacto el extracto celular de la etapa (b) con un tercer resto de unión y un cuarto resto de unión en condiciones adecuadas para transformar la proteína de fusión oncogénica presente en el extracto celular en un complejo que comprende la proteína de fusión oncogénica y el segundo, tercer, y cuarto restos de unión,
- 50 en el que el tercer resto de unión está etiquetado con un resto facilitador y es específico para (por ejemplo, se une de forma específica a) uno o más epítomos presentes en los siguientes dominios o secuencias: (i) el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente; (ii) el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa; o (iii) el sitio de fusión entre el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa y el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente, en el que el cuarto resto de
- 55 unión está etiquetado con un primer miembro de un par de amplificación de señales y es específico para el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente, y en el que el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales.
- En realizaciones en las que las etapas (c) y (d) comprenden un ensayo de detección doble de proximidad, la etapa (d) puede comprender adicionalmente:
- 60 (d') incubar el complejo de la etapa (c') con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
- 65 (d'') detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales.

En ciertas realizaciones, el extracto celular de la etapa (b) se puede poner en contacto con una serie de dilución del segundo resto de unión para formar una pluralidad de complejos que comprenden la proteína de fusión oncogénica y el segundo resto de unión. En algunas realizaciones, el tercer y el cuarto restos de unión pueden comprender un tercer y cuarto anticuerpos, respectivamente. En algunos casos, el tercer y cuarto anticuerpos son ambos anticuerpos independientes del estado de activación. En tales casos, la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales es correlativa a la cantidad total de la proteína de fusión oncogénica. En otros casos, el tercer anticuerpo es un anticuerpo independiente del estado de activación y el cuarto anticuerpo es un anticuerpo dependiente del estado de activación. En tales casos, la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales es correlativa a la cantidad de proteína de fusión oncogénica activada (por ejemplo, fosforilada).

En otras realizaciones, el tercer resto de unión se puede etiquetar directamente con el resto facilitador. Además en otras realizaciones, el cuarto resto de unión está etiquetado directamente con el primer miembro del par de amplificación de señales. En realizaciones alternativas, el cuarto resto de unión está etiquetado con el primer miembro del par de amplificación de señales a través de la unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con el segundo anticuerpo de detección y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de señales. En estas realizaciones, el primer miembro del par de unión es biotina y/o el segundo miembro del par de unión es estreptavidina.

En otras realizaciones, el resto facilitador es glucosa oxidasa. En ciertos casos, la glucosa oxidasa y el tercer resto de unión están conjugados con una molécula de dextrano activado con sulfhidrilo. En tales casos, la molécula de dextrano activado con sulfhidrilo tiene un peso molecular de aproximadamente 500 kDa. En otros casos, el agente oxidante es peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En tales casos, el primer miembro del par de amplificación de señales es una peroxidasa tal como, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), y/o el segundo miembro del par de amplificación de señales es un reactivo de tiramida tal como, por ejemplo, biotina-tiramida. En realizaciones en particular, la señal amplificada está generada por la oxidación con peroxidasa de la biotina-tiramida para producir una tiramida activada. En ciertos casos, la tiramida activada se detecta directamente. En otros casos determinados, la tiramida activada se detecta después de la adición de un reactivo detector de señales. Los ejemplos no limitantes de reactivos detectores de señales incluyen un fluoróforo etiquetado con estreptavidina y una combinación de una peroxidasa etiquetada con estreptavidina y un reactivo cromogénico tal como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

En ciertas realizaciones, los métodos de ensayo de la presente invención comprenden adicionalmente:

- (e) poner en contacto el extracto celular con un quinto resto de unión específico para un segundo dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente en condiciones adecuadas para transformar la segunda proteína de longitud completa diferente presente en el extracto celular en un complejo que comprende la segunda proteína de longitud completa diferente y el quinto resto de unión, en el que el segundo dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente está ausente de la proteína de fusión oncogénica; y
- (f) retirar el complejo de la etapa (e) del extracto celular para formar un extracto celular desprovisto de la segunda proteína de longitud completa diferente,

en los que la etapa (e) se realiza antes, durante, o después de la etapa (a).

En una realización en particular, el quinto resto de unión comprende un quinto anticuerpo. En algunos casos, el quinto anticuerpo está unido a un soporte sólido. Los ejemplos no limitantes de soporte sólidos incluyen vidrio, plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibra, y combinaciones de los mismos. En realizaciones preferentes, el quinto anticuerpo está unido a una perla (por ejemplo, perla magnética, perla de poliestireno, etc.), y la perla funciona como una etiqueta de disminución para retirar la segunda proteína de longitud completa diferente del extracto celular.

La Figura 3A ilustra un ensayo de proximidad a modo de ejemplo (300) para detectar la presencia (nivel total) y/o estado de activación (nivel de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica tal como BCR-ABL (310). El tamaño de la proteína de fusión oncogénica codificada por el gen de BCR-ABL quimérica varía, dependiendo del punto de ruptura del gen BCR. El gen de fusión de BCR-ABL se genera mediante la translocación recíproca del gen ABL situado en el brazo largo del cromosoma 9 y el gen BCR situado en el brazo largo del cromosoma 22, dando como resultado el gen de fusión oncogénico en el cromosoma 22q-, también denominado cromosoma Filadelfia. Véase, por ejemplo, Kurzock *et al.*, N. Engl. J. Med. 319: 990-8 (1988); Rosenberg *et al.*, Adv. In Virus Res. 35: 39-81 (1988). Dependiendo de los puntos de ruptura cromosómicos que translocan el gen ABL en el extremo N-terminal del gen BCR, se forman diferentes longitudes de genes de fusión de BCR-ABL. Se ha determinado que los puntos de ruptura en el gen ABL se distribuyen con respecto a aproximadamente 200 kb entre los exones 1b y a2, y los puntos de ruptura del gen BCR se agrupan dentro de tres regiones; el punto de ruptura principal (M-BCR) entre los exones 13-15 (b2-b4); el punto de ruptura secundario (m-BCR) entre los exones alternativos 1 y 2 (e1 y e2); y el micro punto de ruptura (mu-BCR) en el intrón 19 (e19). Por lo tanto, dependiendo de la recolocación del gen BCR-ABL, se forman proteínas BCL-ABL únicas. Véase, por ejemplo, Konopka *et al.*, Cell 37: 1035-42 (1984); van Dongen, JJM, Leukemia 19: 1292-5 (2005).

La proteína BCR-ABL de tipo p210 se genera a partir de las transcripciones genéticas b3a2 (e14a2) y/o b2a2 (e13a2), que se detectan en más de un 95 % de casos de CML y un subconjunto de ALL. Esta proteína contiene 1790 aminoácidos y está formada por un dominio de oligomerización (OLI) de BCR en el extremo N-terminal, seguido del dominio de S/T quinasa de BCR, una inserción de la secuencia de aminoácidos de BCR que no está presente en BCR normal, seguido de los dominios de SH3, SH2 e Y quinasa de ABL así como el dominio rico en prolina C-terminal de ABL. La proteína de fusión BCR-ABL de tipo p190 está codificada por la transcripción del gen de fusión e1a2 que está asociada principalmente con la ALL positiva para Ph. Los casos raros de CML se deben a una translocación genética de BCR-ABL de tipo p190, y en estos, la enfermedad tiende a tener un componente monocítico importante, que se parece a la leucemia mielocítica crónica (CMML). La proteína BCR-ABL de tipo p230 se forma a partir de la transcripción del gen e19a2 que se ha asociado con la CML neutrofílica, CML clásica y AML. Véase, por ejemplo, Konopka *et al.*, Cell 37: 1035-42 (1984); van Dongen, JJM, Leukemia 19: 1292-5 (2005). Se han descrito casos excepcionales de CML con puntos de ruptura de BCR fuera de las tres regiones de los grupos definidos, o con puntos de ruptura inusuales en ABL (véase, por ejemplo, Melo, Baillieres Clin. Haematol., 10: 203-22 (1997)). El ensayo de proximidad que se describe en el presente documento es capaz de detectar los niveles tanto totales como activados de una proteína BCR-ABL codificada por un gen de BCR-ABL quimérica que tiene un punto de ruptura en cualquier posición dentro del gen BCR.

Como se representa en la Figura 3A, la proteína BCR de longitud completa se puede retirar primero de una muestra del paciente usando una etiqueta de supresión específica para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa (331). Un ejemplo no limitante de una etiqueta de supresión de este tipo es una perla a la que se une un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa (321b). Una vez que la BCR de longitud completa se retira de la muestra, se usa un anticuerpo de captura específico para la región amino-terminal de BCR (BCR-N) para capturar la proteína de fusión BCR-ABL. Una vez que se captura la BCR-ABL mediante la unión entre BCR-N y el anticuerpo de captura específico para BCR-N, se determina la concentración total de BCR-ABL (340), y también se mide la BCR-ABL activada (350). En algunas realizaciones, el resto facilitador (por ejemplo, GO) se acopla a un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de ABL (ABL-C) y el primer miembro del par de amplificación de señales (por ejemplo, HRP) se acopla a un anticuerpo específico para ABL-C en un epítipo diferente al reconocido por el anticuerpo unido al resto facilitador. En ciertos casos, el anticuerpo unido al par de amplificación de señales es un anticuerpo independiente del estado de activación que se une a ABL-C independientemente de su estado de activación y de ese modo mide la concentración total de BCR-ABL (340). En otros casos determinados, el anticuerpo unido al par de amplificación de señales es un anticuerpo dependiente del estado de activación que se une a fosfo-ABL-C (por ejemplo, pY245, pY412) y de ese modo mide la concentración de BCR-ABL activada (350). En una realización alternativa, el resto facilitador (por ejemplo, GO) se acopla a un anticuerpo específico para BCR-N en un epítipo diferente al reconocido por el anticuerpo de captura de BCR-ABL y el primer miembro del par de amplificación de señales (por ejemplo, HRP) se acopla a un anticuerpo específico para ABL-C. El anticuerpo unido al par de amplificación de señales puede ser un anticuerpo independiente del estado de activación o un anticuerpo dependiente del estado de activación como se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, la proteína ABL de longitud completa se puede retirar adicionalmente o como alternativa de la muestra del paciente antes de la captura y detección de la expresión y/o activación de BCR-ABL usando una etiqueta de supresión específica para la región amino-terminal de ABL de longitud completa (330). Un ejemplo no limitante de una etiqueta de supresión de este tipo es una perla a la que se une un anticuerpo específico para la región amino-terminal de ABL de longitud completa (321a). En estas realizaciones, una vez que BCR-ABL se captura mediante la unión entre ABL-C y un anticuerpo de captura específico para ABL-C, se determina la concentración total de BCR-ABL (360), y también se mide la BCR-ABL activada (370). En algunas realizaciones, el resto facilitador (por ejemplo, GO) se acopla a un anticuerpo específico para ABL-C en un epítipo diferente al reconocido por el anticuerpo de captura de BCR-ABL y el primer miembro del par de amplificación de señales (por ejemplo, HRP) se acopla a un anticuerpo específico para BCR-N. En ciertos casos, el anticuerpo unido al resto facilitador es un anticuerpo independiente del estado de activación que se une a ABL-C independientemente de su estado de activación y de ese modo mide la concentración total de BCR-ABL (360). En otros casos determinados, el anticuerpo unido al resto facilitador es un anticuerpo dependiente del estado de activación que se une a fosfo-ABL-C (por ejemplo, pY245, pY412) y de ese modo mide la concentración de BCR-ABL activada (370).

En realizaciones en las que el resto facilitador es GO y el primer miembro del par de amplificación de señales es HRP, la unión tanto del anticuerpo acoplado a GO como del anticuerpo acoplado a HRP a la proteína de fusión de BCR-ABL pone al resto de GO en una proximidad suficiente con respecto al resto HRP de modo que el resto GO (es decir, H₂O₂) genera una señal que se puede canalizar al resto HRP, dando como resultado la generación de una señal detectable y/o amplificable. Una ventaja de la canalización de proximidad, como se usa en los métodos que se describen en el presente documento, es que se genera una sola señal detectable que se correlaciona con los niveles de proteína BCR-ABL total o activada solamente después de la unión de los tres anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo de captura, anticuerpo acoplado al resto facilitador, y anticuerpo unido al par de amplificación de señales), dando como resultado un aumento de la especificidad del ensayo, fondo más bajo, y detección simplificada.

Una realización alternativa (400) para detectar la presencia (nivel total) y/o estado de activación (nivel de fosforilación) de BCR-ABL (410) usando anticuerpos de unión se muestra en la Figura 3B. De nuevo, las perlas

(421a y/o 421b) se usan para retirar las proteínas BCR y/o ABL de longitud completa, a través de, por ejemplo, sus extremos carboxilo y amino terminales, respectivamente. A continuación, al capturar la porción del extremo N-terminal de BCR-ABL usando un resto de unión específico inmovilizado en un soporte sólido, se determina la concentración total de BCR-ABL (440), y también se mide la BCR-ABL activada (450). La proteína BCR-ABL total (460) y activada (470) también se puede determinar mediante la captura de ABL-C ya sea usando un anticuerpo de unión para medir los niveles totales de BCR-ABL o usando un anticuerpo específico de fosforilación de ABL para medir los niveles activados de BCR-ABL.

En particular, la Figura 3B (440) ilustra que la cantidad total de BCR-ABL presente en una muestra biológica tal como suero se puede detectar poniendo en contacto el analito capturado con (i) un primer anticuerpo de detección (es decir, anticuerpo de unión) específico para el sitio o punto de fusión entre la región amino-terminal de BCR (BCR-N) y la región carboxilo-terminal de ABL (ABL-C), y (ii) un segundo anticuerpo de detección específico para ABL-C. Tanto al primer como al segundo anticuerpos de detección se unen a BCR-ABL independientemente de su estado de activación. El primer anticuerpo de detección (es decir, anticuerpo de unión) está etiquetado con glucosa oxidasa (GO), y el segundo anticuerpo de detección está etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La unión tanto del primer como del segundo anticuerpos de detección a la proteína de fusión BCR-ABL pone al resto de GO en una proximidad suficiente con respecto al resto HRP de modo que una señal generada por el resto GO (es decir, H_2O_2) se puede canalizar al resto HRP, dando como resultado la generación de una señal detectable y/o amplificable.

La Figura 3B (450) ilustra adicionalmente que la cantidad de BCR-ABL activada presente en una muestra biológica tal como suero se puede detectar poniendo en contacto el analito capturado con (i) un primer anticuerpo de detección (es decir, anticuerpo de unión) específico para el sitio o punto de fusión entre BCR-N and ABL-C, y (ii) un segundo anticuerpo de detección específico para una forma activada (por ejemplo, fosforilada) de BCR-ABL. El primer anticuerpo de detección se une a BCR-ABL independientemente de su estado de activación, mientras que el segundo anticuerpo de detección se une a un sitio de activación (por ejemplo, fosforilación) presente en el dominio ABL-C de la proteína de fusión. El primer anticuerpo de detección (es decir, anticuerpo de unión) está etiquetado con glucosa oxidasa (GO), y el segundo anticuerpo de detección está etiquetado con peroxidasa de rábano picante (HRP). La unión tanto del primer como del segundo anticuerpos de detección a la proteína de fusión BCR-ABL pone al resto de GO en una proximidad suficiente con respecto al resto HRP de modo que una señal generada por el resto GO (H_2O_2) se puede canalizar al resto HRP, dando como resultado la generación de una señal detectable y/o amplificable.

En realizaciones en las que las etapas (c) y (d) comprenden un ELISA, el ELISA puede comprender un ELISA de sándwich. Para la captura y detección de anticuerpos en un ELISA de sándwich se puede usar cualquier par de anticuerpos adecuado. Alguien con experiencia en la materia sabrá y observará como seleccionar un par de anticuerpos apropiado para el ensayo. Por lo general, se seleccionan dos anticuerpos que se unen a la diana de interés, por ejemplo, BCR-ABL, en epítipo diferentes de modo que la unión del primer anticuerpo (captura) no interfiere con el segundo anticuerpo (detección). En realizaciones preferentes, el primer anticuerpo (captura) se une al segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa (por ejemplo, BCR-N) y el segundo anticuerpo (detección) se une al primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente (por ejemplo, ABL-C). En ciertas realizaciones, el anticuerpo de detección se conjugará con una enzima, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), para ayudar en la detección del complejo. En otras realizaciones, en el ensayo se puede usar un anticuerpo secundario conjugado con una enzima (por ejemplo, HRP o AP), que se une al anticuerpo de detección. Por lo general, a continuación el complejo se detectará mediante el uso de un sustrato luminiscente, por ejemplo, Ultra LITE™ (NAG Research Laboratories); SensoLyte® (AnaSpec); Sustrato de Máxima Sensibilidad SuperSignal ELISA Femto (Thermo Scientific); Sustrato Quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (Thermo Scientific); y CPSD (3-(4-metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricciclo[3,3,1,13,7]decan-4-il)fenil fosfato disódico; Tropix, Inc). El sustrato de CPSD se puede encontrar en sistemas de detección quimioluminiscentes, tales como, por ejemplo, el Sistema ELISA-Light™ (Applied Biosystems). En una realización preferente, ELISA de sándwich de BCR-ABL comprende el uso de un anticuerpo anti-BCR-N como el anticuerpo de captura, en el que era anticuerpo de captura está sujeto en un soporte sólido tal como un pocillo de una microplaca, y un anticuerpo anti-ABL-C conjugado con HRP como el anticuerpo de detección, en el que el anticuerpo de detección puede comprender un anticuerpo independiente del estado de activación o un anticuerpo dependiente del estado de activación (por ejemplo, específico de fosfo).

La Figura 3C ilustra realizaciones de ELISA de sándwich (500) a modo de ejemplo para detectar la presencia (nivel total) y/o estado de activación (nivel de fosforilación) de BCR-ABL (510). Las perlas (521a y/o 521b) se usan para retirar las proteínas BCR y/o ABL de longitud completa, a través de, por ejemplo, sus extremos carboxilo y amino terminales, respectivamente. A continuación, usando ELISA y capturando la porción del extremo N-terminal de BCR-ABL usando un resto de unión específico, se determina la concentración total de BCR-ABL (540), y también se mide la BCR-ABL activada (550). La proteína BCR-ABL total (560) y activada (570) también se puede determinar mediante la captura de ABL-C y a continuación poniendo en contacto la proteína de fusión BCR-ABL capturada con un anticuerpo de detección específico para BCR-N o un anticuerpo de detección específico para el sitio de fosforilación en ABL-C, respectivamente, usando ELISA.

En realizaciones en las que las etapas (c) y (d) comprenden un ensayo de citometría de flujo (FCM), el ensayo de FCM puede comprender un ensayo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). La citometría de flujo es una técnica para hacer el recuento y examen de partículas microscópicas, tales como células, suspendiéndolas en una corriente de fluido y pasándolas por un aparato electrónico de detección. La citometría de flujo permite el análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas y/o químicas de hasta miles de partículas por segundo. En la citometría de flujo, un haz de luz (normalmente luz láser) de una sola longitud de onda se dirige a una corriente de fluido hidrodinámicamente enfocada. Una serie de detectores están dirigidos al punto en el que la corriente pasa por el haz de luz: uno en línea con el haz de luz (Dispersión Directa o FSC) y varios perpendiculares al mismo (Dispersión Lateral (SSC) y uno o más detectores fluorescentes). Cada partícula suspendida de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 150 micrómetros que pasa por el haz dispersa el rayo y los productos químicos fluorescentes encontrados en la partícula o unidos a la partícula se pueden excitar emitiendo luz a una longitud de onda más larga que la fuente de luz. Esta combinación de luz dispersa y fluorescente es captada por los detectores y, al analizar las fluctuaciones y el brillo en cada detector (uno por cada pico de emisión fluorescente), entonces es posible obtener diversos tipos de información con respecto a la estructura física y química de cada partícula individual. La FSC se correlaciona con el volumen celular y la SSC depende de la complejidad interna de la partícula. Algunos citómetros de flujo han eliminado la necesidad de fluorescencia y usan solamente dispersión de luz para la medición, mientras que otros citómetros de flujo forman imágenes de la fluorescencia de cada partícula individual, luz dispersa y luz transmitida.

La FACS es un tipo especializado de citometría de flujo. Esta proporciona un método para clasificar una mezcla heterogénea de partículas en dos o más recipientes, una partícula a la vez, basándose en la dispersión de luz específica y en las características fluorescentes de cada partícula. Es un instrumento científico útil, ya que proporciona un registro rápido, objetivo y cuantitativo de señales fluorescentes de partículas individuales, así como la separación física de partículas de interés en particular. La suspensión de partículas se produce en el centro de una corriente de líquido estrecha y que fluye rápidamente. El flujo está dispuesto de manera que existe una gran separación entre las partículas en relación con su diámetro. Un mecanismo de liberación hace que la corriente de partículas se rompa en gotitas individuales. El sistema se ajusta de manera que hay una baja probabilidad de más de una partícula por gotita. Justo antes de que la corriente se separe en gotitas, el flujo pasa a través de una estación de medición de fluorescencia en la que se mide el carácter fluorescente de interés de cada partícula. Un anillo de carga eléctrica se coloca justo en el punto en el que la corriente se rompe en gotitas. En el anillo se coloca una carga basándose en la medición de la intensidad de fluorescencia inmediatamente anterior y la carga opuesta queda atrapada en la gotita a medida que se separa de la corriente. Las gotitas cargadas a continuación caen mediante un sistema de deflexión electrostática que desvía las gotitas a recipientes basándose en su carga. En algunos sistemas, la carga se aplica directamente a la corriente, y la suspensión de la gotita retiene la carga del mismo signo que la corriente. La corriente a continuación vuelve al estado neutro después de que la gotita se haya suspendido. Un ensayo FACS se puede realizar usando un citómetro de flujo FACS Calibur disponible en BD Biosciences (San Jose, CA).

En ciertas realizaciones, se realiza un ensayo FACS usando dos anticuerpos que se unen a la diana de interés, por ejemplo, BCR-ABL, a diferentes epítopos de tal manera que la unión del primer anticuerpo (captura) no interfiere con el segundo anticuerpo (detección). En realizaciones preferentes, el primer anticuerpo (captura) se une al segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa (por ejemplo, BCR-N) y el segundo anticuerpo (detección) se une al primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente (por ejemplo, ABL-C). En ciertas realizaciones, los anticuerpos de captura se unen a perlas tales como perlas de poliestireno, y las perlas se tiñen internamente con fluoróforos. En algunas realizaciones, el anticuerpo de detección se conjuga con un fluoróforo o una enzima, para ayudar en la detección del complejo. El anticuerpo de detección puede comprender un anticuerpo independiente del estado de activación o un anticuerpo dependiente del estado de activación (por ejemplo, específico de fosfo). En otras realizaciones, en el ensayo se puede usar un fluoróforo, enzima, u otro resto de detección, que se une al anticuerpo de detección. Por lo general, el complejo se puede detectar a continuación como se ha descrito anteriormente.

En realizaciones en las que las etapas (c) y (d) comprenden un ensayo de clasificación de etiquetas, el ensayo de clasificación de etiquetas puede comprender un ensayo Luminex[®]. Los ensayos Luminex[®] están disponibles, por ejemplo, en Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA). En algunos casos, el ensayo de clasificación de etiquetas comprende un formato de ensayo multiplexado Luminex[®]. Por lo general, se seleccionan dos anticuerpos que se unen a la diana de interés, por ejemplo, BCR-ABL, a diferentes epítopos de tal manera que la unión del primer anticuerpo (captura) no interfiere con el segundo anticuerpo (detección). En realizaciones preferentes, el primer anticuerpo (captura) se une al segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa (por ejemplo, BCR-N) y el segundo anticuerpo (detección) se une al primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente (por ejemplo, ABL-C). En ciertas realizaciones, los anticuerpos de captura se unen a perlas de poliestireno, y las perlas se tiñen internamente con fluoróforos de color rojo e infrarrojo de diferentes intensidades. En algunas realizaciones, el anticuerpo de detección se conjuga con un fluoróforo o una enzima, para ayudar en la detección del complejo. El anticuerpo de detección puede comprender un anticuerpo independiente del estado de activación o un anticuerpo dependiente del estado de activación (por ejemplo, específico de fosfo). En otras realizaciones, en el ensayo se puede usar un fluoróforo, enzima, u otro resto de detección, que se une al anticuerpo de detección. Por lo general, el complejo se puede detectar a continuación, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de detección tal

como un sistema de detección Luminex® 100™ o 200™, en el que las perlas se pueden leer en una sola fila con láseres dobles para clasificación y cuantificación de cada analito.

La Figura 3D ilustra realizaciones a modo de ejemplo de citometría de flujo y de clasificación de etiquetas (600) para detectar la presencia (nivel total) y/o estado de activación (nivel de fosforilación) de BCR-ABL (610). Para retirar las proteínas BCR y/o ABL de longitud completa, a través de, por ejemplo, sus extremos carboxilo y amino terminales, respectivamente se usan perlas (621a y/o 621b). A continuación, se usa una perla específica para capturar la porción del extremo N-terminal de BCR-ABL usando un resto de captura específico y una perla específica para el extremo C-terminal de ABL. La proteína total (640) se determina haciendo el recuento de las moléculas con las dos etiquetas específicas o perlas coloreadas. De forma análoga, la cantidad activada de proteína se puede determinar usando una perla con un anticuerpo de captura específico para la porción fosforilada de ABL y el extremo N-terminal de BCR-ABL. Mediante el recuento de estas dos perlas o etiquetas coloreadas específicas, se mide la cantidad de BCR-ABL activada (650). La proteína BCR-ABL total (660) y activada (670) también se puede determinar capturando el extremo C-terminal de ABL con una perla de captura específica y poniendo en contacto la proteína de fusión BCR-ABL capturada con una perla específica para la BCR-N o una perla específica para la porción fosforilada de ABL. Mediante el recuento de estas dos perlas o etiquetas coloreadas específicas, se mide la cantidad de proteína BCR-ABL total (660) o activada (670).

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos adecuados para su uso en los métodos para medir los niveles de proteína BCR-ABL total y/o activada como se ilustra en las Figuras 3A-3D incluyen los que se exponen en la Tabla 1 que sigue a continuación.

Tabla 1. Anticuerpos a modo de ejemplo para los ensayos de BCR-ABL de la presente invención

Diana	Ab	Clon	Epítipo	Vendedor
Bcr	AF5129		N-terminal	R&D
	sc-48422	H-5	N-terminal	Santa Cruz
	1684	EP535Y	C-terminal	Epitomics
Abl	AF5414		C-terminal	R&D
	4G10		fosfo-tirosina	Millipore
	ab62189		pY245	Abcam
	PAB0397		pY245	Novus
	ab47315		pY412	Abcam
	ab55284		pY412	Abcam
	NB100-92665		pY412	Novus

Los ejemplos adicionales de anticuerpos que se unen tanto a proteínas de fusión de BCR-ABL específicas de tumor como a cualquiera de proteínas BCR o ABL de longitud completa nativas no oncogénicas incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo monoclonal 7C6 específico del epítipo BCR b2 reconoce las proteínas BCR-ABL b2a2 p210, BCR-ABL b3a2 p210, BCR p160, y BCR p130 que se describen en Dhut *et al.*, *Oncogene*, 3: 561-6 (1988); el anticuerpo 8E9 específico del dominio SH2 reconoce las proteínas BCR-ABL e1a2 p190, ABL b2a2, b3a2, y p145 se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos n.º 5.369.008 y 6.610.498; el extremo amino-terminal del anticuerpo específico de BCR que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.107.457; y el extremo carboxil-terminal del anticuerpo monoclonal de ratón n.º SC-23 específico de ABL (24-11) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA).

Los ejemplos de anticuerpos de unión adecuados para unión al sitio o punto de fusión dentro de la proteína quimérica BCR-ABL incluyen, pero no se limitan a, el anticuerpo monoclonal n.º 3908 de ratón específico de la unión de b2a2 a BCR-ABL (L99H4) disponible en Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA), los anticuerpos aislados específicos de la proteína de fusión de BCR-ABL p210 que se describen en el documento de Publicación de Patente de Estados Unidos con n.º 20050214301, el anticuerpo policlonal BP-2 específico de la unión de BCR-ABL b3a2 que se describe en van Denderen *et al.*, *Leukemia*, 6: 1107-12 (1992), y el anticuerpo monoclonal (ER-FP1) específico de la unión de BCR-ABL e1a2 que se describe en van Denderen *et al.*, *Leukemia*, 8: 1503-9 (1994). Los anticuerpos de unión a BCR-ABL se pueden usar para la detección de proteínas de fusión de BCR-ABL que se asocia con, pero no se limitan a, leucemias positivas para Ph.

En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención proporcionan la preparación del extracto celular a partir de muestras de médula ósea (por ejemplo, aspirado de médula ósea) o de sangre completa recién recogidas o congeladas mediante recuperación o aislamiento de las células de interés tales como glóbulos blancos (por ejemplo, células de leucemia mielógena crónica (CML)), por ejemplo, usando captura en perla magnética con anticuerpos anti-CD45 y/o anticuerpos anti-CD 15, sin ninguna etapa de lavado después de la recuperación o aislamiento celular.

El extracto celular obtenido de este modo se puede analizar para el nivel de expresión y/o activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas tales como BCR-ABL, sustratos de las mismas, rutas de las mismas, o combinaciones de las mismas. Sin quedar ligado por ninguna teoría en particular, la eliminación de la necesidad de cualquier etapa de lavado después del aislamiento celular es ventajosa porque las células de interés se pueden recuperar de muestras de sangre o médula ósea sin cambiar la concentración intracelular de un fármaco anticáncer tal como un inhibidor de tirosina quinasa. Como se expone en el Ejemplo 9 que sigue a continuación, el aislamiento celular sin ninguna etapa de lavado como se describe en el presente documento es contrario a la práctica aceptada en la técnica de lavado celular después de aislamiento (por ejemplo, lavado de células unidas a perla) y proporciona extractos celulares de células recuperadas sin dilución sustancial de un fármaco anticáncer tal como un inhibidor de tirosina quinasa (por ejemplo, Gleevec[®], Tassigna[®], Sprycel[®], etc.) dentro de las células.

En realizaciones alternativas, los métodos de la presente invención proporcionan la detección simultánea de la cantidad total y/o estado de activación de una proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) en combinación con una o ambas de las proteínas de longitud completa nativas que contienen secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL). En una realización en particular, el presente método permite la detección y/o la medición tanto de los niveles totales de BCR-ABL así como de los niveles totales de BCR y/o ABL de longitud completa nativas en una muestra biológica tal como una muestra de sangre o aspirado de médula ósea. En ciertas realizaciones, los niveles de proteína nativa (por ejemplo, BCR y/o ABL de longitud completa) se determinan junto con los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) de una manera multiplexada en un lecho individual. En estas realizaciones, la proteína de longitud completa nativa se puede aislar de forma ventajosa junto con la proteína de fusión oncogénica de modo que los niveles de estas moléculas se determinan en el mismo lecho.

Como se establece en el Ejemplo 10 que sigue a continuación, estas realizaciones alternativas a los métodos de la presente invención se pueden usar para detectar y/o medir los niveles totales de BCR-ABL así como los niveles totales de BCR o ABL de longitud completa nativa, y se puede calcular una proporción de los niveles totales de BCR-ABL con respecto a los niveles de BCR o ABL de longitud completa nativa. En algunos casos, la proporción de los niveles totales de BCR-ABL con respecto a los niveles de BCR o ABL de longitud completa nativa se calcula para proporcionar una determinación más precisa de indicadores de respuesta tales como, por ejemplo, una respuesta molecular importante (MMR), una respuesta molecular completa (CMR), una respuesta citogenética completa (CCyR), y combinaciones de las mismas. En otros casos, estas realizaciones alternativas a los métodos de la presente invención se pueden usar para controlar cambios en la expresión de BCR-ABL con respecto a un control tal como BCR o ABL de longitud completa (por ejemplo, calculando una proporción de los niveles totales de BCR-ABL con respecto a los niveles de BCR o ABL de longitud completa nativa) como una función de la terapia (por ejemplo, terapia con inhibidor de tirosina quinasa).

Los métodos de la presente invención son particularmente útiles para determinar el estado de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más proteínas de fusión oncogénicas tales como BCR-ABL en pacientes en riesgo de desarrollar, sospechosos de tener, o diagnosticados con un cáncer tal como una neoplasia hematológica (por ejemplo, leucemia, linfoma, etc.). En ciertos casos, los métodos de la presente invención ayudan, asisten, o facilitan el diagnóstico de un cáncer en un sujeto midiendo los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, niveles de fosfo-BCR-ABL) activada (por ejemplo, fosforilada) para determinar si el sujeto expresa una forma activa de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, un paciente positivo para BCR-ABL). En otras realizaciones, los métodos de la presente invención se realizan en un sujeto del que ya se ha determinado que expresa una forma activa de la proteína de fusión oncogénica para optimizar la terapia, reducir la toxicidad, y/o controlar la eficacia del tratamiento terapéutico. En un aspecto de estas realizaciones en particular, en nivel de proteína BCR-ABL activada se puede determinar en un paciente positivo para BCR-ABL durante el ciclo de terapia (por ejemplo, mientras que el paciente se encuentra en terapia con el fármaco anticáncer tal como Gleevec[®], Tassigna[®], Sprycel[®], etc.) para optimizar la terapia, reducir la toxicidad, y/o controlar la eficacia del tratamiento terapéutico. En algunas realizaciones, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). En ciertas realizaciones, la proporción de niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular con respecto a los niveles de una o más proteínas de control tales como, por ejemplo, una o ambas de las proteínas de longitud completa nativas que contienen secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR y/o ABL para la proteína de fusión BCR-ABL). En realizaciones preferentes, el nivel total de la proteína de control no está influido o cambie sustancialmente con la terapia con el fármaco anticáncer.

Los métodos de la presente invención también son particularmente útiles para determinar el estado de activación (por ejemplo, fosforilación) de una o más moléculas de transducción de señales en una o múltiples rutas asociadas

con una proteína de fusión oncogénica tal como BCR-ABL en pacientes en riesgo de desarrollar, de los que se sospecha que tienen, o diagnosticados con un cáncer tal como una neoplasia hematológica (por ejemplo, leucemia, linfoma, etc.). Las moléculas de transducción de señales a modo de ejemplo incluyen sustratos de BCR-ABL tales como, por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1, y combinaciones de los mismos. En ciertos casos, los métodos de la presente invención ayudan, asisten, o facilitan el diagnóstico de un cáncer en un sujeto midiendo los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, niveles de fosfo-BCR-ABL) activada (por ejemplo, fosforilada) y los niveles de molécula de transducción de señales (por ejemplo, niveles de fosfo-CRKL, fosfo-JAK2, fosfo-STAT5, etc.) activada (por ejemplo, fosforilada) para determinar si el sujeto expresa una forma activada de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, un paciente positivo para BCR-ABL) y/o una forma activada de una o más moléculas de transducción de señales en la ruta. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención se realizan en un sujeto del que ya se ha determinado que expresa una forma activada de la proteína de fusión oncogénica para optimizar la terapia, reducir la toxicidad, y/o controlar la eficacia del tratamiento terapéutico. En un aspecto en particular de estas realizaciones, los niveles de proteína BCR-ABL activada y uno o más componentes de la ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, etc.) se pueden determinar en un paciente positivo para BCR-ABL durante el ciclo de terapia (por ejemplo, mientras que el paciente se encuentra en terapia con fármaco anticáncer tal como Gleevec[®], Tasigna[®], Sprycel[®], etc.) para optimizar la terapia, reducir la toxicidad, y/o controlar la eficacia del tratamiento terapéutico. En algunas realizaciones, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular (por ejemplo, con respecto a los niveles de una o más proteínas de control) y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). En otras realizaciones, se miden los niveles de los componentes de la ruta de transducción de señales tanto totales como activados y una proporción de los niveles de componente de la ruta de transducción de señales activado con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total) se puede calcular (por ejemplo, con respecto a los niveles de una o más proteínas de control) y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante comparación de la proporción fosfo/total de los niveles de los componentes de la ruta de transducción de señales con respecto a una proporción de los mismos calculados para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). En ciertos casos, el nivel de expresión de una proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) se puede correlacionar o relacionar con el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de los componentes de transducción de señales corriente abajo tales como CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, etc.

En un aspecto en particular, la presente invención proporciona un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para el tratamiento de cáncer, método que comprende:

- (a) aislar las células cancerosas después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, uno o más inhibidores de tirosina quinasa tales como Gleevec[®], Tasigna[®], Sprycel[®], etc.);
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) medir un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- (d) comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y
- (e) determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (d).

En realizaciones en particular, tanto el nivel de expresión como el nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica se miden en el extracto celular, por ejemplo, realizando uno de los ensayos de proximidad que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones preferentes, la proteína de fusión oncogénica comprende BCR-ABL. En otras ciertas realizaciones preferentes, el sujeto expresa una forma activada de la proteína de fusión oncogénica. En una realización particularmente preferente, el sujeto es positivo para BCR-ABL (por ejemplo, se determinó que el sujeto tenía niveles detectables de fosfo-BCR-ABL antes de la administración del fármaco anticáncer).

En algunas realizaciones, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un

momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). Como se ilustra en el Ejemplo 6 que sigue a continuación, la proporción fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) después de la inhibición con el fármaco anticáncer se correlaciona con el porcentaje de inhibición de la señal de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, fosfo-BCR-ABL) activada (por ejemplo, fosforilada) después del tratamiento con el fármaco anticáncer (véase, por ejemplo, Figuras 14C, 15C, y 16C). En otras realizaciones, la proporción de niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular con respecto a los niveles de una o más proteínas de control tales como, por ejemplo, una o ambas de las proteínas de longitud completa nativas que contienen secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR y/o ABL para BCR-ABL). En realizaciones preferentes, el nivel total de la proteína de control no se ve afectado ni cambia sustancialmente con la terapia con el fármaco anticáncer.

En ciertos aspectos de los métodos que se describen en el presente documento para optimizar la terapia, menos de aproximadamente un 50 % de inhibición de los niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) en un sujeto indica una necesidad de aumentar la dosis posterior del ciclo de terapia o administrar un ciclo de terapia diferente (por ejemplo, cambiar el ciclo de terapia actual mediante intercambio a un fármaco anticáncer diferente) para prevenir o reducir el riesgo de recaída del cáncer en el sujeto. Como un ejemplo no limitante, en los casos en los que el sujeto se encuentra en terapia con Gleevec[®], menos de aproximadamente un 50 % de inhibición del nivel de fosforilación de la proteína de fusión BCR-ABL indica una necesidad de aumentar la dosis de Gleevec[®] o cambiar la terapia del sujeto a Tassigna[®]. En ciertos casos, menos de aproximadamente un 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o un 5 % de inhibición de los niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) en un sujeto indica una necesidad de aumentar la dosis del ciclo de terapia o cambiar el ciclo de terapia actual. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica se puede determinar calculando una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total), opcionalmente con respecto a los niveles de una o más proteínas de control (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL para BCR-ABL), y comparar la proporción de los niveles de fosfo/total de la proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). Un experto en la materia conocerá las dosis adecuadas más elevadas con más bajas a las que se puede ajustar el ciclo de terapia actual de modo que se optimice la terapia con el fármaco, por ejemplo, una dosis posterior que sea 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 más elevada o más baja que la dosis actual.

En otros determinados aspectos de los métodos para optimizar la terapia, menos de aproximadamente un 50 % de inhibición de los niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) en un sujeto indica una falta de cumplimiento del ciclo de terapia por parte del paciente (por ejemplo, el sujeto no está tomando el fármaco anticáncer de forma regular o dirigido por un médico) y/o la existencia de posibles efectos secundarios o toxicidad asociados con el ciclo de terapia. En estas realizaciones, se recomienda que el ciclo de terapia actual se supervise de forma minuciosa (por ejemplo, por un médico u otro profesional sanitario) para su cumplimiento o que se pueda administrar un ciclo de terapia diferente (por ejemplo, el ciclo de terapia actual se puede cambiar mediante el intercambio con un fármaco anticáncer diferente) para aumentar el cumplimiento y/o prevenir o reducir el riesgo de efectos secundarios. En ciertos casos, menos de aproximadamente un 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o un 5 % de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica en un sujeto indica una falta de cumplimiento del ciclo de terapia por parte del paciente y/o la existencia de posibles efectos secundarios o toxicidad asociados con el ciclo de terapia. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica se puede determinar calculando una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total), opcionalmente con respecto a los niveles de una o más proteínas de control (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL para BCR-ABL), y comparar la proporción de los niveles de fosfo/total de la proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer).

En aspectos adicionales de los métodos que se describen en el presente documento para optimizar la terapia, más de aproximadamente un 80 % de inhibición de los niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) en un sujeto indica que el sujeto está con la terapia correcta a la dosis correcta. En ciertos casos, más de aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de inhibición de los niveles de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) en un sujeto indica que el sujeto está con la terapia de fármaco anticáncer correcta con la dosis correcta. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica se puede determinar

calculando una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total), opcionalmente con respecto a los niveles de una o más proteínas de control (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL para BCR-ABL), y a continuación comparando la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer).

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para el tratamiento de cáncer, método que comprende:

(a) aislar las células cancerosas después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, uno o más inhibidores de tirosina quinasa tales como Gleevec[®], Tassigna[®], Sprycel[®], etc.);

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

(c) medir un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica y una o más moléculas de transducción de señales en su ruta en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y

(d) comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y

(e) determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (d).

En realizaciones en particular, tanto el nivel de expresión como el nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica y una o más moléculas de transducción de señales se miden en el extracto celular, por ejemplo, realizando uno de los ensayos de proximidad que se describen en el presente documento. En ciertas realizaciones preferentes, la proteína de fusión oncogénica comprende BCR-ABL. En otras ciertas realizaciones preferentes, las moléculas de transducción de señales incluyen sustratos de BCR-ABL tales como, por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5, Src, FAK, c-ABL, c-CBL, SHC, SHP-2, VAV, BAP-1, y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el sujeto expresa una forma activada de la proteína de fusión oncogénica. En una realización particularmente preferente, el sujeto es positivo para BCR-ABL (por ejemplo, se determinó que el sujeto tenía niveles detectables de fosfo-BCR-ABL antes de la administración del fármaco anticáncer).

En algunas realizaciones, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) (por ejemplo, BCR-ABL) y los niveles de componente de la ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) y una proporción de los niveles de componente de la ruta de transducción de señales activado con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total) se puede calcular y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica y el componente de la ruta de transducción de señales con respecto a una proporción de los mismos calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). En otras realizaciones, la proporción de niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) y la proporción de los niveles de moléculas de transducción de señales activadas con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total) se puede calcular con respecto a los niveles de una o más proteínas de control tal como, por ejemplo, una o ambas de las proteínas de longitud completa nativas que contienen secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR y/o ABL para BCR-ABL). En realizaciones preferentes, el nivel total de la proteína de control no se ve influido o sustancialmente cambiado con la terapia con el fármaco anticáncer.

En ciertos aspectos de los métodos descritos en el presente documento para optimizar la terapia, menos de aproximadamente un 50 % de inhibición de la activación (por ejemplo, fosforilación) de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) y/o niveles de componente de ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) en un sujeto indica una necesidad de aumentar la dosis posterior del ciclo de terapia o administrar un ciclo de terapia diferente (por ejemplo, cambiar el ciclo de terapia actual mediante intercambio a un fármaco anticáncer diferente) para prevenir o reducir el riesgo de recaída del cáncer en el sujeto. Como un ejemplo no limitante, en los casos en los que el sujeto se encuentra en terapia con Gleevec[®], menos de aproximadamente un 50 % de inhibición del nivel de fosforilación de la proteína de fusión BCR-ABL y/o un componente de la ruta de transducción de señales tal como CRKL, JAK2, y/o STAT5 indica una necesidad de aumentar la dosis de Gleevec[®] o cambiar la terapia del sujeto a Tassigna[®]. En ciertos casos, menos de aproximadamente un 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o un 5 % de inhibición de la activación (por ejemplo, fosforilación) de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más

niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) y/o niveles de componente de ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) en un sujeto indica una necesidad de aumentar la dosis del ciclo de terapia o cambiar el ciclo de terapia actual. En algunos casos, el porcentaje de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica y/o molécula de transducción de señales se pueden determinar calculando una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) y/o una proporción de los niveles de componentes de la ruta de transducción de señales de activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total), opcionalmente con respecto a los niveles de una o más proteínas de control (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL para BCR-ABL), y comparar la proporción calculada de fosfo/total con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer). Un experto en la materia conocerá las dosis adecuadas más elevadas con más bajas a las que se puede ajustar el ciclo de terapia actual de modo que se optimice la terapia con el fármaco, por ejemplo, una dosis posterior que sea 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 más elevada o más baja que la dosis actual.

En otros determinados aspectos de los métodos para optimizar la terapia, menos de aproximadamente un 50 % de inhibición de la activación (por ejemplo, fosforilación) de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) y/o niveles de componente de ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) en un sujeto indica una falta de cumplimiento del ciclo de terapia por parte del paciente (por ejemplo, el sujeto no está tomando el fármaco anticáncer de forma regular o dirigido por un médico) y/o la existencia de posibles efectos secundarios o toxicidad asociados con el ciclo de terapia. En estas realizaciones, se recomienda que el ciclo de terapia actual se supervise de forma minuciosa (por ejemplo, por un médico u otro profesional sanitario) para su cumplimiento o que se pueda administrar un ciclo de terapia diferente (por ejemplo, el ciclo de terapia actual se puede cambiar mediante el intercambio con un fármaco anticáncer diferente) para aumentar el cumplimiento y/o prevenir o reducir el riesgo de efectos secundarios. En ciertos casos, menos de aproximadamente un 49 %, 48 %, 47 %, 46 %, 45 %, 44 %, 43 %, 42 %, 41 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o un 5 % de inhibición de la activación de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) y/o niveles de componente de ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) en un sujeto indica una falta de cumplimiento del ciclo de terapia por parte del paciente y/o la existencia de posibles efectos secundarios o toxicidad asociados con el ciclo de terapia. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica y/o molécula de transducción de señales se pueden determinar calculando una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) y/o una proporción de los niveles de componentes de la ruta de transducción de señales de activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total), opcionalmente con respecto a los niveles de una o más proteínas de control (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL para BCR-ABL), y comparar la proporción calculada de fosfo/total con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer).

En aspectos adicionales de los métodos que se describen en el presente documento para optimizar la terapia, más de aproximadamente un 80 % de inhibición de la activación (por ejemplo, fosforilación) de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) y/o niveles de componente de ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) en un sujeto indica que el sujeto está con la terapia correcta a la dosis correcta. En ciertos casos, más de aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % de inhibición de la activación (por ejemplo, fosforilación) de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) y/o niveles de componente de ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) en un sujeto indica que el sujeto está con la terapia de fármaco anticáncer correcta con la dosis correcta. En algunas realizaciones, el porcentaje de inhibición de los niveles de activación de la proteína de fusión oncogénica y/o molécula de transducción de señales se pueden determinar calculando una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) y/o una proporción de los niveles de componentes de la ruta de transducción de señales de activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total), opcionalmente con respecto a los niveles de una o más proteínas de control (por ejemplo, BCR de longitud completa y/o ABL para BCR-ABL), y a continuación comparando la proporción de fosfo/total con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer).

En otros aspectos de los métodos que se describen en el presente documento para optimizar la terapia, la activación de una ruta de transducción de señales alternativa indica una necesidad de cambiar o ajustar el ciclo de terapia actual (por ejemplo, cambiar a un fármaco anticáncer diferente). Como un ejemplo no limitante, en los casos en los

que el sujeto se encuentra en terapia con Gleevec[®], la activación (por ejemplo, fosforilación) de una ruta de transducción de señales alternativa tal como Src indica una necesidad de cambiar la terapia del sujeto por Sprycel[®] o Tasigna[®].

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

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- 10 (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- (d) determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil
- 15 de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- 20 (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de
- 25 captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;
- (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer; y
- (e) indicar que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer cuando cambia el nivel de
- 30 expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden ser útiles para ayudar o asistir en la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden ser útiles para mejorar la selección de un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente o como alternativa la etapa de indicar que el fármaco anticáncer es inadecuado para el tratamiento del cáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente)

35 en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otras realizaciones, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se determina que el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado basándose en este "perfil molecular".

45 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para identificar la respuesta de un cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer, método que comprende:

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- 50 (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- (d) identificar el cáncer como que responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil
- 55 de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- 60 (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de
- 65 captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;

(d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer; y

(e) indicar que el cáncer responde al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando cambia el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden ser útiles para ayudar o asistir en la identificación de la respuesta de un cáncer tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica, para su tratamiento con un fármaco anticáncer. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden ser útiles para mejorar la identificación de la respuesta de un cáncer tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica, para su tratamiento con un fármaco anticáncer. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente o como alternativa la etapa de indicar que el cáncer no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otras realizaciones, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se identifica que el cáncer responde o no responde al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

Además en otro aspecto, la presente invención proporciona un método para predecir la respuesta de un sujeto que tiene cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer, método que comprende:

(a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;

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

(c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y

(d) predecir la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

(a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;

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

(c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;

(d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer; y

(e) indicar que el sujeto probablemente responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica cambia (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden ser útiles para ayudar o asistir en la predicción de la probabilidad de que un sujeto responda al tratamiento con un fármaco anticáncer para un cáncer tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden ser útiles para mejorar la predicción de la probabilidad de que un sujeto responda al tratamiento con un fármaco anticáncer para un cáncer tal como, por ejemplo, una neoplasia hematológica. En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente o como alternativa la etapa de indicar que el sujeto probablemente no responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otras realizaciones, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento se predice basándose en este "perfil molecular".

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

(a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;

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

(c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y

(d) determinar si el sujeto es resistente o sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior.

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

- 10 (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;
- 15 (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior; y
- 20 (e) indicar que el sujeto es resistente al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

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

30 En ciertas realizaciones, el método comprende adicionalmente o como alternativa la etapa de indicar que el sujeto responde al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) detectado para la proteína de fusión oncogénica cambia (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión o activación de referencia. Los ejemplos no limitantes de las razones por las que un sujeto que tiene cáncer podría ser resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer incluyen la presencia de una o más mutaciones en la proteína de fusión oncogénica de interés (por ejemplo, BCR-ABL), no cumplimiento del régimen terapéutico, y/o administración de una dosis de fármaco subóptima. Con respecto a una dosis de fármaco subóptima del fármaco anticáncer, el método puede comprender adicionalmente la etapa de aumentar la dosis siguiente o posterior del fármaco anticáncer administrado al sujeto. En otras realizaciones, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se identifica al sujeto como resistente o sensible al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

45 En realizaciones en particular, el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales se considera que "cambia" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está más o menos expresado o activado en al menos aproximadamente un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % que en ausencia del fármaco anticáncer. En una realización, se considera que el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales "disminuye sustancialmente" en presencia de un fármaco anticáncer cuando está en al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o un 95 % menos expresado o activado que en ausencia del fármaco anticáncer. En otras realizaciones, se considera que el nivel de expresión (por ejemplo, total) y/o nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales "disminuye sustancialmente" en presencia de un fármaco anticáncer (1) cuando hay un cambio de expresión y/o activación elevado o fuerte de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales sin el fármaco anticáncer a una expresión y/o activación media, débil, baja, o muy débil de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales con el fármaco anticáncer, o (2) cuando hay un cambio de expresión y/o activación medio de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales sin el fármaco anticáncer a una expresión y/o activación débil, baja, o muy débil de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales con el fármaco anticáncer.

65 En algunas realizaciones, el nivel de expresión y/o nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales se expresa como un valor de unidad de fluorescencia relativa (RFU) que corresponde a la intensidad de la señal para un analito de interés en particular que se determina usando, por

ejemplo, un ensayo de proximidad tal como el Inmunoensayo de Proximidad Colaborativa (COPIA) que se describe en el presente documento. En otras realizaciones, el nivel de expresión y/o nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++", o "++++" que corresponde al aumento de la intensidad de la señal para un analito de interés en particular que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA. En algunos casos, un nivel de expresión o activación indetectable o mínimamente detectable de la expresión o activación de un analito de interés en particular que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, se puede expresar como "-" o "±". En otros casos, un nivel bajo de expresión o activación de un analito de interés en particular que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, se puede expresar como "+". Además en otros casos, un nivel moderado de expresión o activación de un analito de interés en particular que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, se puede expresar como "++". Aún en otros casos más, un nivel elevado de expresión o activación de un analito de interés en particular que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, se puede expresar como "+++". En casos adicionales, un nivel muy elevado de expresión o activación de un analito de interés en particular que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, se puede expresar como "++++".

Además en otras realizaciones, el nivel de expresión y/o nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales se cuantifica calibrando o normalizando el valor de RFU que se determina usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, frente a una curva patrón generada para el analito de interés en particular. En ciertos casos, un valor de unidades de cálculo (CU) se puede calcular basándose en la curva patrón. En otros casos, el valor de CU se puede expresar como "-", "±", "+", "++", "+++", o "++++" de acuerdo con la descripción mencionada anteriormente para intensidad de la señal.

En ciertas realizaciones, el nivel de expresión o activación de un analito de interés en particular, cuando se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++", o "++++", puede corresponder a un nivel de expresión o activación que es 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 más elevado o más bajo (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 más elevado o más bajo) que un nivel de expresión o 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 por el analito de interés, cuando se compara con un control positivo tal como un control de 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 determinado en ausencia de un fármaco anticáncer. En algunos casos, la correlación es específica del analito. Como un ejemplo no limitante, un nivel de expresión o activación "+" determinado usando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como COPIA, debe corresponder a un aumento de 2 veces de la expresión o activación para un analito y un aumento de 5 veces para otro analito cuando se compara con un nivel de expresión o activación de referencia.

En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, BCR-ABL) o molécula de transducción de señales tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y se puede calcular una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) o una proporción de los niveles de molécula de transducción de señales activada con respecto a la total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total) y a continuación se pueden comparar con una proporción de la misma calculada basándose en los perfiles de expresión y activación de referencia generados en ausencia del fármaco anticáncer.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión o activación de referencia de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) se obtiene a partir de una célula normal tal como una célula no cancerosa de un individuo sano que no tiene un cáncer tal como una neoplasia hematológica. En otras determinadas realizaciones, el nivel de expresión o activación de referencia de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) se obtiene a partir de una célula tumoral de una muestra (por ejemplo, extracto celular) de un paciente con un cáncer tal como leucemia o linfoma.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión o activación de referencia de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) se obtiene a partir de una célula (por ejemplo, una célula tumoral obtenida a partir de una muestra del paciente) que no está tratado con el fármaco anticáncer. En realizaciones en particular, la célula que no está tratada con el fármaco anticáncer se obtiene a partir de la misma muestra que la célula aislada (por ejemplo, una célula de ensayo a examinar) usada para producir el extracto celular. En ciertos casos, la presencia de un nivel más bajo de expresión o activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, el tumor presenta un aumento de la probabilidad de respuesta al fármaco anticáncer). En otros casos determinados, la presencia de un nivel idéntico, similar, o más elevado de expresión o activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es inadecuado para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, el tumor presenta una disminución de la probabilidad de respuesta al fármaco anticáncer).

- En realizaciones alternativas, el nivel de expresión o activación de referencia de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) se obtiene a partir de una célula que sensible al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer. En las realizaciones de este tipo, la presencia de un nivel idéntico, similar o más bajo de expresión o activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, el tumor presenta un aumento de la probabilidad de respuesta al fármaco anticáncer). En otras ciertas realizaciones alternativas, el nivel de expresión o activación de referencia de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) se obtiene a partir de una célula resistente al fármaco anticáncer que se trata con el fármaco anticáncer.
- En las realizaciones de este tipo, la presencia de un nivel idéntico, similar, o más elevado de expresión o activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales en comparación con el nivel de expresión o activación de referencia indica que el fármaco anticáncer es inadecuado para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, el tumor presenta una disminución de la probabilidad de respuesta al fármaco anticáncer).
- En ciertas realizaciones, se considera que un nivel más elevado de expresión o activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es 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 más elevado (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 más elevado) que el nivel de expresión o activación de referencia del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula cancerosa obtenida a partir de una muestra del paciente) no tratado con el fármaco anticáncer, en una célula que responde al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer, o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.
- En otras realizaciones, se considera que un nivel más bajo de expresión o activación de la proteína de fusión oncogénica o molécula de transducción de señales determinado en la etapa (c) está presente en un extracto celular cuando el nivel de expresión o activación es 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 más bajo (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 más bajo) que el nivel de expresión o activación de referencia del analito correspondiente en una célula (por ejemplo, una célula cancerosa obtenida a partir de una muestra del paciente) no tratado con el fármaco anticáncer, en una célula que responde al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer, o en una célula resistente al fármaco anticáncer tratada con el fármaco anticáncer.

35 A. Matrices de anticuerpo

- En un aspecto, la presente invención proporciona una matriz que tiene un intervalo dinámico superior que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para uno o más analitos en un extracto celular, en la que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido.
- En algunas realizaciones, el extracto celular se prepara a partir de una muestra de sangre completa, orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspiración a través del pezón, linfa, saliva, y/o aspiración con aguja fina (FNA). Como un ejemplo no limitante, primero se separa una muestra de sangre completa en una fracción de plasma o suero y una fracción celular (es decir, sedimento celular). La fracción celular por lo general contiene glóbulos rojos, glóbulos blancos (leucocitos), y/o células en circulación de un tumor sólido tales como células tumorales en circulación (CTC), células endoteliales en circulación endoteliales en circulación (CEC), células precursoras endoteliales en circulación (CEPC), células madre cancerosas (CSC), y combinaciones de las mismas. Las células aisladas presentes en la fracción celular se pueden lisar para transformar de ese modo las células aisladas en un extracto celular mediante cualquier técnica conocida en la técnica.
- En algunos casos, el extracto celular comprende un extracto de células en circulación de un tumor sólido. Las células en circulación por lo general se aíslan de una muestra del paciente usando uno o más métodos de separación que incluyen, 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)), separación microfluida (véase, por ejemplo, Mohamed *et al.*, IEEE Trans. Nanobiosci., 3: 251-256 (2004); Lin *et al.*, Resumen con n.º 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D.C. (2006)), FACS (véase, por ejemplo, Mancuso *et al.*, Blood, 97: 3658-3661 (2001)), centrifugación en gradiente de densidad (véase, por ejemplo, Baker *et al.*, Clin. Cancer Res., 13: 4865-4871 (2003)), y métodos de supresión (véase, por ejemplo, Meye *et al.*, Int. J. Oncol., 21: 521-530 (2002)).
- En otros casos, el extracto celular comprende un extracto de leucocitos tales como granulocitos (leucocitos polimorfonucleares), que incluyen, por ejemplo, neutrófilos, basófilos, y eosinófilos; agranulocitos (leucocitos mononucleares), que incluyen, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica tales como linfocitos y monocitos, y macrófagos; y mezclas de los mismos. Los leucocitos se pueden aislar a partir de sangre completa usando cualquier método de separación conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-HyPaque, lisis hipotónica de glóbulos rojos, y el uso de medios de gradiente de densidad tales como Lymphoprep™ y Polymorphprep™ (Axis-Shield; Oslo, Noruega).

En ciertas realizaciones, los leucocitos aislados, células en circulación, u otras células (por ejemplo, células obtenidas a partir de un tumor sólido a través de aspiración con aguja fina) se pueden estimular *in vitro* con uno o más factores de crecimiento antes, durante, y/o después de la incubación con uno o más fármacos anticáncer de interés. Los factores de crecimiento estimuladores incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento epidérmico (EGF), herregulina (HRG), TGF- α , PIGF, angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, citoquinas, y similares. En otros casos, las células aisladas se pueden lisar, por ejemplo, después de tratamiento de estimulación con factor de crecimiento y/o fármaco anticáncer, para producir el extracto celular (por ejemplo, lisado celular) usando cualquier técnica conocida en la técnica. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación con factor de crecimiento, y más preferentemente a dos intervalos de tiempo diferentes: (1) a aproximadamente 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 celular se puede almacenar a -80 °C hasta su uso. Los protocolos para el aislamiento, estimulación y lisis de células en circulación se describen en el documento de Publicación de PCT con n.º WO 2008/036802. Los protocolos para la preparación de extractos de células tumorales a partir de tejido, biopsia, o cultivos primarios se describen en el documento de Publicación de PCT con n.º WO 2009/108637.

En ciertas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente antiseñalización (es decir, un fármaco citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa; un agente antiproliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto por la capacidad para reducir o anular el crecimiento descontrolado de células anómalas tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, las células aisladas se tratan con uno o más agentes antiseñalización, agentes anti-proliferativos, y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de agentes antiseñalización incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin®), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), gemtuzumab (Mylotarg®), panitumumab (Vectibix™), rituximab (Rituxan®), y tositumomab (BEXXAR®); inhibidores de tirosina quinasa tales como mesilato de imatinib (Gleevec®), nilotinib (Tasigna®), dasatinib (Sprycel®), bosutinib (SKI-606), gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW-572016; Tykerb®), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar®), leflunomida (SU101), y que vandetanib (ZACTIMA™; ZD6474); y combinaciones de los mismos.

Los agentes anti-proliferativos a modo de ejemplo incluyen inhibidores de mTOR tales como sirolimus (rapamicina), temsirolimus (CCI-779), y everolimus (RAD001); inhibidores de Akt tales como 1L6-hidroximetil-quirositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-*sn*-glicerocarbonato, acetato de 9-metoxi-2-metileipticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g]quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-benzoimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complejo de Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido 15-mer obtenido a partir de los aminoácidos 10-24 del proto-oncogén TCL1 (Hiromura *et al.*, J. Biol. Chem., 279: 53407-53418 (2004), KP372-1, y los compuestos que se describen en Kozikowski *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 125: 1144-1145 (2003) y Kau *et al.*, Cancer Cell, 4: 463-476 (2003); 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, busulfano, melfalano, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, *etc*), antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, azatioprina, 6-mercaptoporina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina (Gemzar®), pemetrexed (ALIMTA®), raltitrexed, *etc.*), alcaloides de plantas (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), *etc*), inhibidores de la 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, pero no se limitan a, 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 receptor de estrógenos (por ejemplo, bazedoxifeno, clomifeno, fulvestrant, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, *etc*), esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasterida, y agonistas de 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 no limitantes de vacunas para el cáncer 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 no se limitan a, 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 con anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.

5 En realizaciones en particular, el uno o más analitos presentes en el extracto celular comprenden una o una pluralidad de las proteínas de fusión oncogénicas, solo o en combinación con una o una pluralidad de moléculas de transducción de señales. Los ejemplos no limitantes de proteínas de fusión oncogénicas y moléculas de transducción de señales de interés se han descrito anteriormente.

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

15 En otras realizaciones, el soporte sólido comprende vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibra, o cualquier otro sustrato adecuado. En una realización preferente, los anticuerpos de captura están sujetos (por ejemplo, mediante interacciones covalentes o no covalentes) en portaobjetos de vidrio revestidos con un polímero de nitrocelulosa tal como, por ejemplo, Portaobjetos FAST[®], que están disponibles en el mercado en Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

25 Como un ejemplo no limitante, una micromatriz direccionable de la presente invención puede comprender una serie de dilución de anticuerpo de captura para determinar el estado de activación de BCR-ABL en un extracto celular, en la que el anticuerpo de captura se refiere al dominio de BCR de la proteína de fusión BCR-ABL y los anticuerpos de detección (por ejemplo, los anticuerpos tanto dependientes del estado de activación como independientes del estado de activación) se dirigen al dominio de ABL. En una realización alternativa, tanto los anticuerpos de captura como los independientes del estado de activación se dirigen al dominio de BCR de la proteína de fusión BCR-ABL y el anticuerpo dependiente del estado de activación se refiere al dominio de ABL. Las matrices pueden comprender adicionalmente una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes dirigidos contra proteínas de fusión y/o moléculas de transducción de señales adicionales en una serie de concentraciones decrecientes (es decir, diluciones en serie), en las que los anticuerpos de captura se acoplan a la superficie del soporte sólido en diferentes ubicaciones direccionables.

35 Un experto en la materia observará que la matriz puede ser cualquier configuración que permita señales discretas para cada una de las proteínas de fusión oncogénica activadas y/o moléculas de transducción de señales a detectar. Por ejemplo, la matriz puede ser una línea o una rejilla de regiones distintas (por ejemplo, puntos o aplicaciones puntuales) en la superficie del soporte, en la que cada región contiene un anticuerpo de captura o agente de captura diferente (es decir, para unir la etiqueta de captura presente en el anticuerpo de captura). La matriz se puede configurar para su uso en metros en los que los estados de activación de una pluralidad de las proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales se detectan en un ensayo multiplexado, individual. En diversas realizaciones, la pluralidad comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales. En realizaciones en particular, la pluralidad comprende la proteína de fusión BCR-ABL en combinación con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más proteínas de fusión oncogénicas y/o moléculas de transducción de señales adicionales.

B. Ensayos de Detección Doble de Proximidad

50 En aspectos en particular, los ensayos de la presente invención para detectar el estado de activación de un analito de interés en particular en un extracto celular de leucocitos u otros tipos de células tales como células en circulación de un tumor sólido es un ensayo de proximidad de alto rendimiento, multiplexado (es decir, tres anticuerpos) que tiene un intervalo dinámico superior.

55 Como un ejemplo no limitante, en situaciones en las que el analito es una sola proteína (por ejemplo, EGFR), los tres anticuerpos usados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para el analito; (2) un anticuerpo de detección específico para una forma 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 es capaz de detectar, por ejemplo, la fosforilación, ubiquitinación, y/o estado de formación de complejos del analito. El anticuerpo independiente del estado de activación por lo general es capaz de detectar las formas tanto activadas como no activadas del analito.

65 Como otro ejemplo no limitante, en situaciones en las que el analito es una proteína de fusión (por ejemplo, BCR-ABL) que contiene un primer dominio que corresponde a una proteína (por ejemplo, BCR) que está condensado con un segundo dominio que corresponde a otra proteína (por ejemplo, ABL), los tres anticuerpos usados en el ensayo

de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico para el primer dominio de la proteína de fusión; (2) un anticuerpo de detección específico para una forma activada del segundo dominio de la proteína de fusión (es decir, anticuerpo dependiente del estado de activación); y (3) un anticuerpo de detección que detecta la cantidad total de la proteína de fusión mediante la unión de forma específica al segundo dominio de la proteína de fusión independientemente de su estado de activación (es decir, anticuerpo independiente del estado de activación). El anticuerpo dependiente del estado de activación es capaz de detectar, por ejemplo, la fosforilación, ubiquitinación, y/o estado de formación de complejos de la proteína de fusión. El anticuerpo independiente del estado de activación por lo general es capaz de detectar las formas tanto activadas como no activadas de la proteína de fusión.

10 En un aspecto preferente, la presente invención proporciona un método para realizar un inmunoensayo de alto rendimiento, multiplexado que tiene un intervalo dinámico superior, método que comprende:

15 (a) incubar un extracto celular con una o una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para una o más proteínas de fusión para formar una pluralidad de proteínas de fusión capturadas, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido, en el que cada proteína de fusión comprende un primer dominio que corresponde a una primera proteína y un segundo dominio que corresponde a una segunda proteína diferente, y en el que los anticuerpos de captura son específicos para el primer dominio de las proteínas de fusión;

20 (b) incubar la pluralidad de proteínas de fusión capturadas con anticuerpos de detección específicos para el segundo dominio de las proteínas de fusión para formar una pluralidad de detectable proteínas de fusión capturadas, en el que los anticuerpos de detección comprenden:

(1) una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación etiquetados con un resto facilitador,
y
25 (2) una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación etiquetados con un primer miembro de un par de amplificación de señales,

en el que el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;

30 (c) incubar la pluralidad de detectable proteínas de fusión capturadas con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
(d) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales.

35 En un aspecto alternativo, el método para realizar un inmunoensayo de alto rendimiento, multiplexado que tiene un intervalo dinámico superior comprende:

40 (a) incubar un extracto celular con una o una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para una o más proteínas de fusión para formar una pluralidad de proteínas de fusión capturadas, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido, en el que cada proteína de fusión comprende un primer dominio que corresponde a una primera proteína y un segundo dominio que corresponde a una segunda proteína diferente, y en el que los anticuerpos de captura son específicos para el primer dominio de las proteínas de fusión;

45 (b) incubar la pluralidad de proteínas de fusión capturadas con anticuerpos de detección para formar una pluralidad de detectable proteínas de fusión capturadas, en el que los anticuerpos de detección comprenden:

(1) una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación etiquetados con un resto facilitador, en el que los anticuerpos independientes del estado de activación son específicos para el primer dominio de las proteínas de fusión, y
50 (2) una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación etiquetados con un primer miembro de un par de amplificación de señales, en este los anticuerpos dependientes del estado de activación son específicos para el segundo dominio de las proteínas de fusión,

en el que el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;

55 (c) incubar la pluralidad de detectable proteínas de fusión capturadas con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
(d) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales.

60 En otro aspecto alternativo, el método para realizar un inmunoensayo de alto rendimiento, multiplexado que tiene un intervalo dinámico superior comprende:

65 (a) incubar un extracto celular con una o una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura específicos para una o más proteínas de fusión para formar una pluralidad de proteínas de fusión capturadas, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido, en el que cada proteína de fusión

comprende un primer dominio que corresponde a una primera proteína y un segundo dominio que corresponde a una segunda proteína diferente, y en el que los anticuerpos de captura son específicos para el primer dominio de las proteínas de fusión;

(b) incubar la pluralidad de proteínas de fusión capturadas con anticuerpos de detección para formar una pluralidad de detectable proteínas de fusión capturadas, en el que los anticuerpos de detección comprenden:

(1) una pluralidad de anticuerpos independientes del estado de activación etiquetados con un resto facilitador, en el que los anticuerpos independientes del estado de activación son específicos para la secuencia, sitio, o punto de fusión entre el primer y segundo dominios de las proteínas de fusión (es decir, anticuerpos de unión), y

(2) una pluralidad de anticuerpos dependientes del estado de activación etiquetados con un primer miembro de un par de amplificación de señales, en el que los anticuerpos dependientes del estado de activación son específicos para el segundo dominio de las proteínas de fusión,

en el que el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;

(c) incubar la pluralidad de detectable proteínas de fusión capturadas con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y

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

En ciertas realizaciones, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión. Los ejemplos de moléculas de transducción de señales de interés se han descrito anteriormente e incluyen, pero no se limitan a, tirosina quinasas receptoras, tirosina quinasas no receptoras, y/o componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa. Las moléculas de transducción de señales se pueden detectar usando los métodos que se describen en el presente documento, excepto porque los tres anticuerpos (es decir, el anticuerpo de captura y ambos anticuerpos de detección) se dirigen contra la misma proteína, o usando cualquier método conocido por alguien con experiencia en la materia. Además, las moléculas de transducción de señales se pueden detectar usando los ensayos de detección individual (es decir, *dos anticuerpos*) que se describen en el documento de Publicación de PCT con n.º WO 2008/036802. En realizaciones en particular, se detecta una o más de las moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular en conjunto con uno o más proteínas de fusión usando los inmunoensayos y matices que se describen en el presente documento.

En algunos casos, el extracto celular se incuba con anticuerpos de captura que ya están sujetos en un soporte sólido. En otros casos, el extracto celular se incuba en primer lugar con anticuerpos de captura en solución y a continuación se ponen en contacto con un soporte sólido para inmovilizar los analitos capturados, por ejemplo, mediante etiquetas de captura presentes en los anticuerpos de captura que interactúan con los agentes de captura unidos al soporte sólido.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de detección se incuban con analitos que están unidos a los anticuerpos de captura en solución o sujetos en un soporte sólido. En ciertos casos, el extracto celular que comprende una pluralidad de analitos se incuba en primer lugar con los anticuerpos de detección en solución y a continuación se pone en contacto con anticuerpos de captura en solución o sujetos a un soporte sólido. En otros casos determinados, el extracto celular que comprende una pluralidad de analitos se incuba primer lugar con anticuerpos de captura y anticuerpos de detección en solución y a continuación se pone en contacto con un soporte sólido para inmovilizar los complejos anticuerpo-analito, por ejemplo, mediante etiquetas de captura presentes en los anticuerpos de captura o los anticuerpos de detección que interactúan con los agentes de captura unidos al soporte sólido. Antes de la etapa de detección, los complejos inmovilizados se pueden lavar para retirar anticuerpos que no formen complejos, los complejos lavados se pueden liberar secuencialmente de la superficie del soporte, y la canalización de proximidad para cada uno de los analitos que se somete a ensayo se puede detectar mediante un método adecuado como se describe en el presente documento.

En realizaciones donde la superficie del soporte comprende agentes de captura sujetos en una matriz, la etapa de incubación puede comprender poner en contacto el extracto celular que comprende una pluralidad de analitos en solución con los anticuerpos de captura y los anticuerpos de detección, usando un exceso de los tres anticuerpos para impulsar la reacción hasta la finalización. En una variación del método, los complejos anticuerpo-analitos resultantes se unen a una fase sólida y se lavan para retirar los anticuerpos no unidos. Como se representa en la Figura 2 del documento de Publicación de PCT con n.º WO 2008/036802, el anticuerpo **1** de captura puede comprender la etiqueta **10** de captura. Los complejos están unidos a una fase sólida **12** a través de un agente **11** de captura que está adherido a la fase sólida y se une a la etiqueta de captura, inmovilizando de ese modo el complejo. El complejo inmovilizado se lava con un tampón adecuado, y a continuación se libera de la fase sólida mediante la adición de un agente **13** de liberación. El agente de liberación puede funcionar mediante cualquier mecanismo que dé como resultado la liberación del complejo lavado. En una realización, la etiqueta de captura comprende un sitio escindible que se reconoce y se escinde por parte del agente de liberación. En otra realización, representada en la Figura 2, el agente de liberación compite con la etiqueta de captura por la unión al agente de captura. Por ejemplo, el agente de captura puede ser un primer oligonucleótido que se hibrida con un oligonucleótido parcialmente

complementario (es decir, la etiqueta de captura) unido al anticuerpo de captura; y el agente de liberación puede ser un oligonucleótido que es completamente complementario al agente de captura, que da como resultado un desplazamiento de hebra y la liberación del complejo lavado de la fase sólida. Otros ejemplos de etiquetas de captura/agentes de captura/agentes de liberación adecuados que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, 2,4-dinitrofenol (DNP)/anticuerpo anti-DNP/2,4-DNP lisina; T2/anticuerpo anti-T3/T3; ouabaína/anticuerpo anti-digoxina/digoxina; y destiobiotina/estreptavidina/biotina (véase, por ejemplo, Ishikawa *et al.*, J. Clin. Lab Anal., 12: 98-107 (1998)).

Después de que el complejo de lavado se libere de la fase sólida: (1) se pone en contacto con una superficie de soporte que comprende moléculas de captura sujetas en una matriz que une específicamente etiquetas de captura en el anticuerpo de captura, o (2) se disocia, y los anticuerpos de detección disociados se ponen en contacto con una superficie de soporte que comprende agentes de captura que unen específicamente etiquetas de captura en los anticuerpos de detección. La Figura 2 del documento de Publicación de PCT con n.º WO 2008/036802 representa la realización donde el complejo lavado se disocia y los anticuerpos de detección disociados se ponen en contacto con la superficie 14 de soporte. La superficie de soporte comprende una pluralidad de moléculas de captura sujetas a una matriz "direccionable" o de "código postal". Cada región distinta de la matriz comprende un agente 9 de captura único que une específicamente la etiqueta 8 de captura presente en el anticuerpo 2 de detección independiente de estado de activación o el anticuerpo 3 dependiente de estado de activación, sujetando de ese modo y organizando los anticuerpos de detección etiquetados en la matriz. En una realización preferente, los agentes de captura y las etiquetas de captura son oligonucleótidos que se hibridan específicamente entre sí. Las matrices direccionables que comprenden moléculas de captura de oligonucleótido se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Keramas *et al.* Lab Chip, 4: 152-158 (2004); Delrio-Lafreniere *et al.*, Diag. Microbiol. Infect. Dis., 48: 23-31 (2004)).

La presencia de los anticuerpos de detección en cada distinta región de la matriz se puede detectar directa o indirectamente con un resto tal como un resto facilitador o un primer miembro de un par de amplificación de señales. Algunos ejemplos de restos que se pueden detectar directamente incluyen fluoróforos, cromóforos, oro coloidal, látex coloreado, etc. En una realización, ambos restos son independientemente fluoróforos seleccionados. Se puede usar cualquier par de fluoróforos que proporcione una lectura distinguible mientras se encuentren en proximidad cercana entre sí, tal como, por ejemplo, Cy3/Cy5, Cy5/ficoertrina, y similares. Como alternativa, si se usa una matriz direccionable de oligonucleótidos, ambos restos pueden ser el mismo fluoróforo suministrado a diferentes códigos postales. Se puede usar microscopía confocal láser de barrido para detectar restos de fluoróforo que se adhieren en la matriz. En los ensayos donde los complejos se liberan de la matriz antes de la detección, tales como ensayos de desplazamiento de hebra, algunos métodos adecuados para detectar los restos de fluoróforo incluyen fluorescencia inducida por láser confocal de flujo capilar, nano-HPLC, electroforesis micro-capilar, etc.

En algunas realizaciones, los anticuerpos independientes del estado de activación comprenden además un resto detectable. En tales casos, la cantidad del resto detectable correlaciona con la cantidad de uno o más de los analitos del extracto celular. Algunos ejemplos de restos detectables incluyen, pero no se limitan a, marcas fluorescentes, marcas químicamente reactivas, marcas de enzima, marcas reactivas, y similares. Preferentemente, el resto detectable es un fluoróforo tal como un colorante de Alexa Fluor[®] (por ejemplo, Alexa Fluor[®] 647), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green[™]; rodamina, rojo de Texas, isotiocianato de tetra-rodamina (TRITC), un colorante de CyDye[™] (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5), y similares. El resto detectable se puede acoplar directa o indirectamente a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos bien conocidos en la técnica.

En ciertos casos, los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados directamente con el resto facilitador. El resto facilitador se puede acoplar a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos bien conocidos en la técnica. Un resto facilitador adecuado para su uso en la presente invención incluye cualquier molécula capaz de generar un agente oxidante que se canaliza a (es decir, se dirige a) y reacciona con (es decir, se une, se une mediante, o forma un complejo con) otra molécula en proximidad (es decir, cercana o próxima espacialmente) al resto facilitador. Algunos ejemplos de restos facilitadores incluyen, pero no se limitan a, enzimas tales como glucosa oxidasa (GO) o cualquier otra enzima que catalice una reacción de oxidación/reducción que implique oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones, y fotosensibilizadores tales como azul de metileno, rosa de bengala, porfirinas, colorantes de escuarato, ftalocianinas, y similares. Algunos 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 facilitador (por ejemplo, glucosa oxidasa, fotosensibilizador, etc.) genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), oxígeno individual, etc.) que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), hapteno protegido por un grupo protector, una enzima inactivada mediante una unión tioéter a un inhibidor enzimático, etc.) cuando los dos restos están en proximidad entre sí.

La preparación de moléculas de dextrano modificadas con sulfhidrilo y su uso en la preparación de conjugados entre un anticuerpo y un resto facilitador tal como glucosa oxidasa (GO) se describe en el documento de Publicación de PCT con n.º WO 2009/108637.

En otros casos determinados, los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados indirectamente con el resto facilitador a través de hibridación entre un conector de oligonucleótido conjugado al resto facilitador. Los conectores de oligonucleótido se pueden acoplar al resto facilitador o a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el conector de oligonucleótido conjugado al resto facilitador tiene un 100% de complementariedad con el conector de oligonucleótido conjugado a los anticuerpos independientes del estado de activación. En otras realizaciones, la pareja de conectores de oligonucleótido comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más regiones de falta de coincidencia, por ejemplo, después de hibridación en condiciones de hibridación rigurosas. El experto en la materia entenderá que los anticuerpos independientes del estado de activación específicos para diferentes analíticos se pueden conjugar al mismo conector de oligonucleótido o a diferentes conectores de oligonucleótido.

La longitud de los conectores de oligonucleótido que se conjugan al resto facilitador o a los anticuerpos independientes del estado de activación puede variar. En general, la secuencia del conector puede tener al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, o 100 nucleótidos de longitud. Por lo general, se generan secuencias aleatorias de ácidos nucleicos para el acoplamiento. A modo de ejemplo no limitante, se puede diseñar una librería de conectores de oligonucleótido que tengan tres dominios contiguos distintos: un dominio espaciador; un dominio de firma; y un dominio de conjugación. Preferentemente, los conectores de oligonucleótido se diseñan para acoplamiento eficaz sin destruir la función del resto facilitador o los anticuerpos independientes del estado de activación a los que están conjugados.

Las secuencias del conector de oligonucleótido se pueden diseñar para prevenir o minimizar cualquier formación estructural secundaria en una diversidad de condiciones de ensayo. Por lo general, las temperaturas de fusión se monitorizan cuidadosamente para cada segmento dentro del conector para permitir su participación en los procesos de ensayo globales. Generalmente, el intervalo de temperaturas de fusión del segmento de la secuencia de conector es no mayor de 5 °C. Se pueden usar algoritmos por ordenador (por ejemplo, OLIGO 6.0) para determinar la temperatura de fusión, estructura secundaria, y estructura de horquilla en concentraciones iónicas definidas para analizar cada uno de los tres dominios diferentes dentro de cada conector. Las secuencias combinadas globales también se pueden analizar para su caracterización estructural y su capacidad de comparación con otras secuencias de conector de oligonucleótido conjugado, por ejemplo, si se hibridarán en condiciones de hibridación rigurosas a un conector de oligonucleótido complementario.

La región de espaciador del conector de oligonucleótido proporciona una separación adecuada del dominio de conjugación desde el sitio de reticulación del oligonucleótido. El dominio de conjugación funciona para unir moléculas marcadas a una secuencia de conector de oligonucleótido complementaria al dominio de conjugación a través de hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación mediada por ácidos nucleicos se puede llevar 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 numerosos métodos de conjugación de anticuerpo directos, la unión relativamente débil de los oligonucleótidos a los anticuerpos u otras moléculas tiene un impacto mínimo en la afinidad específica de los anticuerpos hacia su analito diana o en la función de las moléculas conjugadas.

En algunas realizaciones, el dominio de secuencia de firma del conector de oligonucleótido se puede usar en ensayos de proteína de complejo multiplexado. Se pueden conjugar múltiples anticuerpos con conectores de oligonucleótido con diferentes secuencias de firma. En inmunoensayos multiplexados, se pueden usar secuencias de oligonucleótido de indicador marcadas con sondas apropiadas para detectar hibridación cruzada entre anticuerpos y sus antígenos en el formato de ensayo multiplexado.

Los conectores de oligonucleótido se pueden conjugar a anticuerpos u otras moléculas usando varios métodos diferentes. Por ejemplo, los conectores de oligonucleótido se pueden sintetizar con un grupo tiol en cualquiera de los extremos 5' o 3'. El grupo tiol se puede desproteger usando agentes reductores (por ejemplo, TCEP-HCl) y los conectores resultantes se pueden purificar usando una columna de centrifugación de desalación. Los conectores de oligonucleótido desprotegidos resultantes se pueden conjugar a las aminas primarias de los anticuerpos u otros tipos de proteínas usando conectores cruzados heterodifuncionales tales como SMCC. Como alternativa, se pueden tratar los grupos 5'-fosfato de los oligonucleótidos con carbodiimida soluble en agua EDC para formar ésteres de fosfato y finalmente acoplarse a moléculas que contienen aminas. En ciertos casos, el diol del resto de 3'-ribosa se puede oxidar a grupos aldehído y a continuación conjugarse a los grupos amina de anticuerpos u otros tipos de proteína usando aminación reductora. En otros casos determinados, el conector de oligonucleótido se puede sintetizar con una modificación de biotina en cualquiera de los extremos 3' o 5' y conjugarse a moléculas marcadas con estreptavidina.

Los conectores de oligonucleótido se pueden sintetizar usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, tales como las que se describen 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 hace uso de grupos protectores y de acoplamiento comunes de ácidos nucleicos, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditos en extremo 3'. Los expertos en la materia conocen los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, los métodos para la desprotección de ácidos nucleicos, y los métodos para la purificación de ácidos nucleicos.

La preparación y el uso de anticuerpos conjugados con oligonucleótidos para detección simultánea de analitos totales y fosforilados se describe en el documento de Publicación de PCT con n.º WO 2008/036802.

5 En ciertos casos, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados directamente con el primer miembro del par de amplificación de señales. El miembro del par de amplificación de señales se puede acoplar a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos bien conocidos en la técnica. En otros casos determinados, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de señales mediante enlace 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 con el primer miembro del par de amplificación de señales. Los miembros del par de unión (por ejemplo, biotina/estreptavidina) se pueden acoplar al miembro del par de amplificación de señales o a los anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos de miembros de pares de amplificación de señales incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, peroxidasa de citocromo c, peroxidasa de eosinófilo, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa tiroidea, desyodinasas, y similares. Otros ejemplos de miembros del par de amplificación de señales incluyen haptenos protegidos mediante un grupo protector y enzimas inactivadas mediante unión de tioéter a un inhibidor enzimático.

20 Los anticuerpos de captura, los anticuerpos independientes del estado de activación, y los anticuerpos dependientes del estado de activación se seleccionan por lo general para minimizar la competición entre ellos con respecto a la unión del analito (es decir, todo los anticuerpos se pueden unir simultáneamente a sus correspondientes proteínas de fusión o moléculas de transducción de señales).

25 En un ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es glucosa oxidasa (GO) y el primer miembro del par de amplificación de señales es peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato tal como glucosa, genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Si la HRP está en la proximidad de la canalización a la GO, el H_2O_2 generado por la GO se canaliza a y forma un complejo con la HRP para formar un complejo HRP- H_2O_2 , que, en presencia del segundo miembro del par de amplificación de señales (por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico tal como tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida), ácido homovainílico, o ácido 4-hidroxifenilacético), genera una señal amplificada. Los métodos de uso de GO y HRP en un ensayo de proximidad se describen, por ejemplo, en Langry *et al.*, Informe del Departamento de Energía de los Estados Unidos con n.º UCRL-ID-136797 (1999). Cuando se usa biotina-tiramida como el segundo miembro del par de amplificación de señales, el complejo HRP- H_2O_2 oxida la tiramida para generar un radical tiramida reactivo que se une covalentemente a los residuos nucleófilos próximos. La tiramida activada se detecta directamente o se detecta después de la adición de un reactivo de detección de señal tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Algunos ejemplos de fluoróforos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, un colorante de Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, rojo de Texas, isotiocianato de tetra rodamina (TRITC), un colorante de CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5), y similares. La marca de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente al fluoróforo o a la peroxidasa usando métodos bien conocidos en la técnica. Algunos 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-etilbenzotiazolona-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN), y/o porfirinógeno.

45 En otro ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de señales es una molécula grande marcada con múltiples haptenos que están protegidos con grupos protectores que evitan la unión de los haptenos a un compañero de unión específica (por ejemplo, ligando, anticuerpo, etc.). Por ejemplo, el miembro del par de amplificación de señales puede ser una molécula de dextrano marcada con moléculas protegidas de biotina, cumarina y/o fluoresceína. Algunos grupos protectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos protectores fenoxi-, analino-, olefina-, tioéter-, y selenoéter-. Algunos fotosensibilizadores y moléculas de hapteno protegidas adicionales adecuados para su uso en los ensayos de proximidad de la presente invención se describen en el documento de Patente de Estados Unidos con n.º 5.807.675. Cuando el fotosensibilizador se excita con luz, genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). Si las moléculas de hapteno están dentro de la proximidad de canalización al fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza a y reacciona con los tioéteres de los grupos protectores de los haptenos para producir grupos carbonilo (cetonas o aldehídos) y ácido sulfínico, liberando los grupos protectores de los haptenos. Los haptenos sin proteger están a continuación disponibles para unirse específicamente al segundo miembro del par de amplificación de señales (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 enzima. Algunas enzimas a modo de ejemplo incluyen fosfatasa alcalina, p-galactosidasa, HRP, etc. Después de lavar para retirar los reactivos que no se hayan unido, la señal detectable se puede generar por adición de un sustrato detectable (por ejemplo, fluorescente, quimioluminiscente, cromogénico, etc.) de la enzima y se puede detectar usando métodos e instrumentación adecuados conocidos en la técnica. Como alternativa, la señal detectable se puede amplificar usando amplificación de señal mediante tiramida y la tiramida activada se puede detectar directamente o se puede detectar tras la adición de un reactivo de detección de señal

como se ha descrito anteriormente.

En otro ejemplo más de canalización de proximidad, el resto facilitador es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de señales es un complejo enzima-inhibidor. La enzima y el inhibidor (por ejemplo, dextrano marcado con ácido fosfónico) están unidos juntos mediante un conector escindible (por ejemplo, tioéter). Cuando el fotosensibilizador se excita con luz, genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singlete). Si el complejo enzima-inhibidor está dentro de la proximidad de canalización al fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza a y reacciona con el conector escindible, liberando el inhibidor de la enzima, activando de ese modo la enzima. Se añade un sustrato de enzima para generar una señal detectable o, como alternativa, se añade un reactivo de amplificación para generar una señal amplificada.

En un ejemplo adicional de la canalización de proximidad, el resto facilitador es HRP, el primer miembro del par de amplificación de señales 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 fenilendiimina y H₂O₂ genera una fenilendiimina reactiva que se canaliza al hapteno protegido o al complejo enzima-inhibidor y reacciona con los grupos protectores p-alcoxi fenol para producir haptenos expuestos o una enzima reactiva. La señal amplificada se genera y se detecta como se ha descrito anteriormente (véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos con n.^{os} 5.532.138 y 5.445.944).

El experto en la materia entenderá que se pueden usar compañeros de unión distintos de los anticuerpos para inmovilizar y/o detectar uno o más analitos de un extracto celular de acuerdo con los ensayos de proximidad (es decir, tres anticuerpos) que se describen en el presente documento. Algunos ejemplos no limitantes de tales compañeros de unión incluyen ligandos o receptores del analito, sustratos del analito, dominios de unión (por ejemplo, PTB, SH2, etc.), aptámeros, y similares.

Un protocolo a modo de ejemplo para llevar a cabo los ensayos de proximidad que se describen en el presente documento se proporciona en el Ejemplo 1.

En otra realización, la presente invención proporciona kits para llevar a cabo los ensayos de proximidad que se han descrito anteriormente que comprenden: (a) una serie de diluciones de una pluralidad de anticuerpos de captura sujetos en un soporte sólido; y (b) una pluralidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para los métodos de uso del kit para detectar los estados de activación de uno o una pluralidad de proteínas de fusión y/o moléculas de transducción de señales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales que se han descrito anteriormente con respecto a la realización de los métodos específicos de la presente invención tales como, por ejemplo, el primer y el segundo miembros del par de amplificación de señales, reactivos de amplificación de señal de tiramida, sustratos para el resto facilitador, tampones de lavado, etc.

40 **IV. Construcción de matrices de anticuerpos**

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona matrices basadas en anticuerpo para detectar el estado de activación de una pluralidad de proteínas de fusión en un extracto celular usando una serie de dilución de anticuerpos de captura sujetos en un soporte sólido. Las matrices que se usan en los ensayos de la presente invención comprenden por lo general una pluralidad de uno o más anticuerpos de captura diferentes en un intervalo de concentraciones de anticuerpo de captura que se acoplan a una superficie de un soporte sólido en diferentes ubicaciones direccionables.

El soporte sólido puede comprender cualquier sustrato adecuado para inmovilizar proteínas. Algunos ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, virutas, pasadores, filtros, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas de poliestireno, etc.), papel, membranas, haces de fibra, geles, metal, materiales cerámicos, y similares. Las membranas tales como 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 están sujetos en portaobjetos de vidrio revestidos con un polímero de nitrocelulosa, por ejemplo, FAST® Slides, que están disponibles en el mercado en Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Los aspectos particulares del soporte sólido que son deseables incluyen la capacidad de unir grandes cantidades de anticuerpos de captura, la capacidad de unir anticuerpos de captura con una desnaturalización mínima, y la incapacidad de unir otras proteínas. Otro aspecto adecuado es que el soporte sólido presente un "drenaje" mínimo cuando las soluciones de anticuerpo que contienen los anticuerpos de captura se aplican al soporte. Un soporte sólido con un drenaje mínimo permite que se apliquen pequeñas alícuotas de solución de anticuerpo de captura al soporte para dar como resultado aplicaciones puntuales pequeñas y definidas de anticuerpo de captura inmovilizado.

Los anticuerpos de captura están sujetos por lo general directa o indirectamente (por ejemplo, a través de etiquetas)

en el soporte sólido a través de 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 reticulador homodifuncional o heterodifuncional que usa métodos y condiciones de reticulación convencionales. Algunos reticuladores adecuados están disponibles en el mercado en proveedores tales como, por ejemplo, Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Los métodos para generar las matrices de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cualquier técnica usada para construir matrices de proteína o ácido nucleico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de captura se aplican puntualmente sobre una matriz usando un microaparato de aplicación puntual, que son por lo general impresoras robóticas equipadas con pasadores divididos, pasadores romos, o impresión por inyección de tinta. Algunos sistemas robóticos adecuados para imprimir las matrices de anticuerpo que se describen en el presente documento incluyen el robot PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) con pasadores divididos ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA) así como otras impresoras robóticas disponibles en BioRobics (Woburn, MA) y Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferentemente, al menos 2, 3, 4, 5 o 6 duplicados de cada dilución de anticuerpo de captura se aplican puntualmente sobre la matriz.

Otro método para generar las matrices de anticuerpo de la presente invención comprende dispensar un volumen conocido de dilución de anticuerpo de captura a cada posición de la matriz seleccionada poniendo en contacto un dispensador capilar sobre un soporte sólido en condiciones eficaces para estirar 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 de la matriz seleccionada para crear una matriz completa. El método se puede poner en práctica en la formación de una pluralidad de tales matrices, en el que la etapa de deposición de solución se aplica a una posición seleccionada en cada uno de una pluralidad de soportes sólidos en cada ciclo de repetición. Una descripción adicional de un método de este tipo se puede encontrar, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos con n.º 5.807.522.

En ciertos casos, se pueden usar dispositivos para imprimir sobre papel para generar las matrices de anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la dilución de anticuerpo de captura deseada se puede cargar en el cabezal de impresión de una impresora de inyección de sobremesa y se puede 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 aplicaciones puntuales/cm², y preferentemente al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000, o 10.000 aplicaciones puntuales/cm².

En ciertos casos, las aplicaciones puntuales sobre el soporte sólido representan cada una un anticuerpo de captura diferente. En otros casos determinados, múltiples aplicaciones puntuales sobre el soporte sólido representan el mismo anticuerpo de captura, por ejemplo, en forma de una serie de dilución que comprende una serie de concentraciones descendentes de anticuerpo de captura.

Algunos ejemplos adicionales de métodos para preparar y construir matrices de anticuerpo sobre soportes sólidos se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos con n.ºs 6.197.599, 6.777.239, 6.780.582, 6.897.073, 7.179.638, y 7.192.720; los documentos de Publicación de Patente de Estados Unidos con n.ºs 20060115810, 20060263837, 20060292680, y 20070054326; y Varnum *et al.*, Methods Mol. Biol., 264: 161-172 (2004).

Se conocen en la técnica métodos para escanear matrices de anticuerpo e incluyen, pero no se limitan a, cualquier técnica usada para escanear matrices de proteína o ácido nucleico. Algunos escáneres de micromatrices adecuados para su uso en la presente invención están disponibles en PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA), y Axon Instruments (Union City, CA). A modo de ejemplo no limitante, se puede usar un sistema GSI ScanArray3000 para detección de fluorescencia con software ImaGene para cuantificación.

V. Selección de fármacos y optimización para terapia del cáncer

En ciertos aspectos, la presente invención proporciona métodos para la selección de terapias apropiadas para regular negativamente o suprimir una o más rutas de señalización desreguladas. En ciertos otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para optimizar una terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para tratamiento de cáncer. Por lo tanto, la presente invención se puede usar para facilitar el diseño de terapias personalizadas basadas en una firma molecular particular proporcionada por la recogida de las proteínas de fusión oncogénicas activadas y/o las proteínas de transducción de señal en un cáncer o tumor de paciente dado.

Por consiguiente, en un aspecto en particular, la presente invención proporciona un método para optimizar la terapia

y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para el tratamiento de cáncer, método que comprende:

- 5 (a) aislar las células cancerosas después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, uno o más inhibidores de tirosina quinasa tales como Gleevec[®], Tassigna[®], Sprycel[®], etc.);
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) medir un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- 10 (d) comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y
- (e) determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (d).

- 15 En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles
- 20 de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer).

25 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para el tratamiento de cáncer, método que comprende:

- 30 (a) aislar las células cancerosas después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, uno o más inhibidores de tirosina quinasa tales como Gleevec[®], Tassigna[®], Sprycel[®], etc.);
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) medir un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica y una o más moléculas de transducción de señales en su ruta en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- 35 (d) comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y
- (e) determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (d).

- 40 En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) (por ejemplo, BCR-ABL) y los niveles de componente de la ruta de transducción de señales (por ejemplo, CRKL, JAK2, STAT5) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) y una proporción de los niveles de
- 45 componente de la ruta de transducción de señales activado con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína CRKL, JAK2, o STAT5 fosfo/total) se puede calcular y usar para evaluar el ciclo de terapia para un sujeto, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica y el componente de la ruta de transducción de señales con respecto a una proporción de los mismos calculada para el sujeto en un momento anterior (por ejemplo, en un momento anterior a la vez que se está con la
- 50 terapia con el fármaco anticáncer o en un momento en el tiempo antes de la terapia con el fármaco anticáncer).

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

- 55 (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- 60 (d) determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- 5 (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;
- (c) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer; y
- 10 (e) indicar que el fármaco anticáncer es adecuado para el tratamiento del cáncer cuando cambia el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En ciertos casos, la realización preferente puede comprender adicionalmente, es decir, como etapa (f), o como alternativa puede comprender, es decir como etapa (e), la etapa de indicar que el fármaco anticáncer es inadecuado para el tratamiento del cáncer cuando el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otros casos, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se determina que el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado basándose en este based "perfil molecular".

En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada basándose después de que se hayan generado los perfiles de expresión y activación de referencia en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- 40 (d) identificar el cáncer como que responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- 50 (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;
- (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer; y
- 55 (e) indicar que el cáncer responde al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica cambia (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En ciertos casos, la realización preferente puede comprender adicionalmente, es decir, como etapa (f), o como alternativa puede comprender, es decir, como etapa (e), la etapa de indicar que el cáncer no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otros casos, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se identifica que el cáncer responde o no responde al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para identificar si el

5 cáncer responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada basándose en los perfiles de expresión y activación de referencia que se generaron en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- 15 (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- (d) predecir la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil
- 20 de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- 25 (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de
- 30 captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;
- (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer; y
- 35 (e) indicar que el sujeto probablemente responderá al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica cambia (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En ciertos casos, la realización preferente puede comprender adicionalmente, es decir, como etapa (f), o como alternativa comprende, es decir, como etapa (e), la etapa de indicar que el sujeto probablemente no responderá al

40 tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otros casos, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento se predice basándose en este "perfil molecular".

En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por

50 ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para predecir si el sujeto presentará una probabilidad de responder al tratamiento con el fármaco anticáncer, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada basándose en los perfiles de expresión y activación de referencia que se generaron en ausencia del fármaco anticáncer.

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

- (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- 60 (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo descrito en el presente documento; y
- (d) determinar si el sujeto es resistente o responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil
- 65 de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior.

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

- 5 (a) aislar las células de un cáncer después de la administración de un fármaco anticáncer, o antes de la incubación con un fármaco anticáncer;
- (b) lisar las células aisladas para producir un extracto celular;
- (c) determinar un nivel de expresión y/o activación (por ejemplo, fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular usando un ensayo que comprende una serie de dilución de anticuerpos de captura específico para la proteína de fusión oncogénica, en el que los anticuerpos de captura están sujetos en un soporte sólido;
- 10 (d) comparar el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un perfil de expresión y/o activación de referencia generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior; y
- 15 (e) indicar que el sujeto es resistente al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica no cambia (por ejemplo, no disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia.

En ciertos casos, la realización preferente puede comprender adicionalmente, es decir, como etapa (f), o como alternativa puede comprender, es decir, como etapa (e), la etapa de indicar que el sujeto responde al tratamiento con el fármaco anticáncer cuando el nivel de expresión y/o de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica cambia (por ejemplo, disminuye sustancialmente) en comparación con el perfil de expresión y/o activación de referencia. En otros casos, se detecta una o más moléculas de transducción de señales presentes en el extracto celular además de una o más proteínas de fusión oncogénicas, y se identifica al sujeto como resistente o sensible al tratamiento basándose en este "perfil molecular".

En realizaciones en particular, los niveles de proteína de fusión oncogénica tanto total como activada (por ejemplo, fosforilada) se miden en el extracto celular de acuerdo con los ensayos basados en anticuerpo de la presente invención y una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total (por ejemplo, una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total) se puede calcular y usar para determinar si el sujeto es resistente o sensible al tratamiento con el fármaco anticáncer, por ejemplo, mediante la comparación de la proporción de fosfo/total de los niveles de proteína de fusión oncogénica con respecto a una proporción de la misma calculada basándose en los perfiles de expresión y activación de referencia que se generaron en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden comprender adicionalmente enviar o informar de los resultados de la etapa (d) a un profesional médico, por ejemplo, un oncólogo o un médico general. En otras realizaciones, los métodos de la presente invención pueden comprender adicionalmente registrarla marginar los resultados de la etapa (d) en una base de datos informática u otra máquina o dispositivo adecuados para el almacenamiento de información, por ejemplo, en un laboratorio.

En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden comprender adicionalmente la etapa de obtener una muestra de un sujeto que tiene cáncer del que se aíslan células tales como células cancerosas. La muestra se a tener a partir de un sujeto ya sea antes del tratamiento con el fármaco anticáncer (por ejemplo, antes de la incubación con un fármaco anticáncer) o después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, en cualquier momento durante el transcurso del tratamiento para el cáncer). Las muestras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sangre completa, plasma, suero, fluido de lavado ductal, aspiración a través 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, aspiración con aguja fina (por ejemplo, cosechadas mediante aspiración aleatoria con aguja fina periareolar), cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (por ejemplo, tejido tumoral) tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo, biopsia con aguja) o un ganglio linfático (por ejemplo, biopsia del ganglio linfático centinela), y extractos celulares de los mismos. En algunas realizaciones, la muestra es sangre completa o un componente fraccionario de la misma tal como plasma, suero, glóbulos rojos, leucocitos tales como células mononucleares de sangre periférica, y/o células en circulación raras. En realizaciones en particular, la muestra se obtiene aislando leucocitos o células en circulación de un tumor sólido a partir de sangre completa o una fracción celular de la misma usando cualquier técnica conocida en la técnica. Si las células aisladas se obtienen a partir un sujeto que no ha recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, las células aisladas se pueden incubar *in vitro* en condiciones adecuadas con uno o un cóctel de fármacos anticáncer que se dirigen a uno o más de los analitos a detectar en la etapa (c).

En ciertas realizaciones, el cáncer es una neoplasia hematológica (por ejemplo, leucemia, linfoma), sarcoma osteogénico (por ejemplo, sarcoma de Ewing), sarcoma de tejido blando (por ejemplo, DFSP, rabdomiosarcoma), otra neoplasia de tejido blando, carcinoma tiroideo papilar, o cáncer de próstata. En realizaciones en particular, el cáncer está causado por la formación de una proteína de fusión oncogénica debido a una translocación cromosómica en las células cancerosas o tumor.

En algunas realizaciones, las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento como se describe en

el presente documento. En otras realizaciones, el fármaco anticáncer puede comprender una o más de los agentes terapéuticos descritos en el presente documento, que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, y vacunas.

5 En algunas realizaciones, el estado de activación detectado para la proteína de fusión oncogénica presente en el extracto celular puede ser, por ejemplo, un estado de fosforilación, un estado de ubiquitinación, un estado de formación de complejos, o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el soporte sólido puede comprender, por ejemplo, vidrio, plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibra, y combinaciones de los mismos. Además en otras realizaciones, los anticuerpos de captura están sujetos en el soporte sólido en una matriz direccionable.

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

- 15 (i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) el extracto celular con la serie de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas capturadas (por ejemplo, para transformar las proteínas de fusión oncogénicas presentes en el extracto celular en complejos de proteínas de fusión oncogénicas capturadas que comprenden las proteínas de fusión oncogénicas y anticuerpos de captura);
- 20 (ii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas capturadas con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para el mismo o diferente dominio de la proteína de fusión oncogénica para formar una pluralidad de proteínas de fusión oncogénicas capturadas detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de proteínas de fusión oncogénicas capturadas en complejos de proteínas de fusión oncogénicas capturadas detectables que comprenden las proteínas de fusión oncogénicas capturadas y anticuerpos de detección),
- 25 en el que los anticuerpos independientes del estado de activación están etiquetados con un resto facilitador, los anticuerpos dependientes del estado de activación están etiquetados con un primer miembro de un par de amplificación de señales, y el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;
- 30 (iii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados detectables con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
- (iv) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales.

35 Los anticuerpos independientes del estado de activación se pueden etiquetar directamente con el resto facilitador o se pueden etiquetar indirectamente con el resto facilitador, por ejemplo, a través de hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con el resto facilitador. De forma análoga, los anticuerpos dependientes del estado de activación se pueden etiquetar directamente con el primer miembro del par de amplificación de señales o se pueden etiquetar indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de señales, por ejemplo, a través de la unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con los anticuerpos dependientes del estado de activación y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de señales. En ciertos 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.

45 En algunas realizaciones, el resto facilitador puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa (GO). En ciertos casos, la GO y los anticuerpos independientes del estado de activación se pueden conjugar con una molécula de dextrano activado con sulfhidrilo. La molécula de dextrano activado con sulfhidrilo por lo general tiene 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). Además en otras realizaciones, el primer miembro del par de amplificación de señales puede ser, por ejemplo, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRP). En otras realizaciones, 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 por oxidación de la peroxidasa de la biotina-tiramida para producir una tiramida activada (por ejemplo, para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada se puede detectar directamente o se puede detectar indirectamente, por ejemplo, después de la adición de un reactivo de detección de señales. Los ejemplos no limitantes de reactivos de detección de señales incluyen fluoróforos etiquetados con estreptavidina y combinaciones de peroxidases etiquetadas con estreptavidina y reactivos que cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).

60 En ciertos casos, la HRP y los anticuerpos dependientes del estado de activación se pueden conjugar con una molécula de dextrano activado con sulfhidrilo. La molécula de dextrano activado con sulfhidrilo por lo general tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo, aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 kDa).

65

VI. Producción de anticuerpos

La generación y selección de anticuerpos aún no disponibles en el mercado para analizar los estados de activación de las proteínas de fusión oncogénicas o las moléculas de transducción de señales en una muestra biológica tal como un extracto celular o lisado de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo de varias formas. Por ejemplo, una forma es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, un antígeno) usando métodos de expresión y purificación de proteínas conocidos en la técnica, mientras que otra forma es sintetizar el polipéptido de interés usando métodos de síntesis de péptidos 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). El polipéptido purificado o sintetizado se puede inyectar, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. El experto en la materia reconocerá que están disponibles numerosos 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). El experto en la materia también entenderá que también se pueden preparar fragmentos de unión o fragmentos Fab que mimetizan (por ejemplo, retienen las regiones funcionales de unión de) anticuerpos a partir de la 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 informado del uso de la tecnología de presentación en fagos para producir y analizar sistemáticamente librerías de polipéptidos para su 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.*, documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.571.698). Un concepto básico en los métodos de presentación en fagos es el establecimiento de una asociación física entre un polipéptido codificado por el ADN del fago y un antígeno diana. Esta asociación física se proporciona mediante la partícula del fago, que presenta un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite el análisis sistemático en masa simultáneo de números muy elevados de fagos que portan diferentes polipéptidos. Los fagos que presentan un polipéptido con afinidad a un antígeno diana se unen al antígeno diana y esos fagos se enriquecen mediante análisis sistemático de afinidad en el antígeno diana. La identidad de los polipéptidos presentados por estos fagos se puede determinar a partir de sus respectivos genomas. Usando estos métodos, a continuación se puede sintetizar en masa un polipéptido identificado como que tiene afinidad de unión por un antígeno deseado mediante métodos convencionales (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 6.057.098).

Los anticuerpos que se generan mediante estos métodos se pueden seleccionar en primer lugar mediante análisis sistemático de afinidad y especificidad con el antígeno de polipéptido purificado de interés y, si se requiere, comparar los resultados de la afinidad y especificidad de los anticuerpos con otros antígenos de polipéptido que se desea que se excluyan de la unión. El procedimiento de análisis sistemático puede implicar la inmovilización de antígenos de polipéptido purificados en pocillos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo o grupo de anticuerpos potenciales se coloca a continuación en los respectivos pocillos de microtitulación y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas. A continuación, los pocillos de microtitulación se lavan y se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina si los anticuerpos obtenidos son anticuerpos de ratón) a los pocillos y se incuban durante aproximadamente 30 minutos y a continuación se lava. Se añade un sustrato los pocillos y una reacción de color hará aparecer el lugar en el que está presente el anticuerpo en el antígeno de polipéptido inmovilizado.

A continuación, los anticuerpos identificados de ese modo se pueden analizar adicionalmente para afinidad y especificidad. En el desarrollo de 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 la afinidad de unión de los diversos anticuerpos puede diferir, por ejemplo, ciertas combinaciones de anticuerpos pueden interferir entre sí estéricamente, el rendimiento del 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 se pueden adoptar numerosos enfoques en la producción de anticuerpos o fragmentos de unión y en el análisis sistemático y la selección por afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos de interés, pero estos enfoques no cambian el alcance de la presente invención.

A. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se obtienen 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 vehículo de proteína que sea inmunogénico en las especies que se inmunizan, tal como, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente difuncional o de derivatización. Algunos ejemplos no limitantes de agentes difuncionales o de derivatización

incluyen éster de maleimidobenzóilo de sulfosuccinimida (conjugación a través de los restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (conjugación a través de los restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , y $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R_1 son grupos alquilo diferentes.

5 Los animales se inmunizan frente al polipéptido de interés o un conjugado o derivado inmunogénico del mismo por combinación, por ejemplo, de 100 μg (para conejos) o 5 μg (para ratones) del antígeno o conjugado con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyección de la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales se estimulan con aproximadamente 1/5 o 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, los animales se sangran y el suero se somete a ensayo para la concentración de anticuerpo. Los animales se estimulan por lo general hasta que la concentración alcanza una meseta. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo polipéptido, pero se puede usar conjugación a una proteína inmunogénica diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden usar conjugados en cultivos celulares recombinantes en forma de proteínas de fusión. En ciertos casos, se pueden usar agentes de agregación tales como alumbre para mejorar la respuesta inmune.

B. Anticuerpos monoclonales

20 Los anticuerpos monoclonales se obtienen generalmente a partir de una población de anticuerpos básicamente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades minoritarias. De ese modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando el método del hibridoma descrito por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) o mediante cualquier método de ADN recombinante conocido en la técnica (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567).

30 En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal hospedador apropiado (por ejemplo, un hámster) como se ha descrito anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unen específicamente al polipéptido de interés usado para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se inmunizan *in vitro*. Los linfocitos inmunizados se fusionan a continuación 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, pp. 59-103 (1986)). Las células de hibridoma preparadas de ese modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente uno o más sustratos que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma precursoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma precursoras carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), el medio de cultivo para las células de hibridoma incluirá por lo general hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), que evita el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

40 Las células de mieloma preferentes son las que se fusionan de forma eficaz, soportan la producción estable a alto nivel de anticuerpo mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y/o son sensibles a un medio tal como medio HAT. Algunos ejemplos de tales líneas celulares de mieloma preferentes para la producción de anticuerpos monoclonales humanos incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino tales como las que se obtienen a partir de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 (disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), células SP-2 o X63-Ag8-653 (disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo; Rockville, MD), y líneas celulares de mieloma humano o 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, pp. 51-63 (1987)).

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

55 Después de que se hayan identificado las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad, y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivo mediante métodos convencionales (véase, por ejemplo, Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, pp. 59-103 (1986)). Algunos medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* en forma de tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, el fluido de ascitis, o el suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía sobre hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad.

65 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos

convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan 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 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). El ADN también se puede modificar, por ejemplo, por sustitución de la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o por unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina.

En una realización más, los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpo monoclonales se pueden aislar a partir de librerías de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas que se describen, por ejemplo, en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990); Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991). La producción de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad (en el intervalo nM) mediante barajado de cadena se describe en Marks *et al.*, *BioTechnology*, 10: 779-783 (1992). El uso de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir librerías muy grandes de fagos se describe en Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). De ese modo, estas técnicas son alternativas viables a los métodos de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales 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 el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan a menudo restos "importados", que se toman por lo general de un dominio variable "importado". La humanización se lleva a cabo básicamente mediante la sustitución de las secuencias de la 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 lo tanto, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos n.º 4.816.567), en los que se ha sustituido básicamente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son por lo general anticuerpos humanos en los que se sustituyen algunos restos de la región variable y posiblemente algunos restos de la región marco conservada (FR) por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La selección de los dominios variables humanos, tanto ligero como pesado, que se usan en la preparación de los anticuerpos humanizados que se describen en el presente documento es una consideración importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se analiza sistemáticamente frente a la librería completa de secuencias de dominio variable humanas. La secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta a continuación como el FR humano para el anticuerpo humanizado (véanse, por ejemplo, Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); y Chotia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa un FR particular obtenido a partir de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar el mismo FR para varios anticuerpos humanizados diferentes (véanse, por ejemplo, Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados se pueden preparar mediante un proceso de análisis de las secuencias precursoras y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias precursoras y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales se encuentran disponibles habitualmente y son familiares para los expertos en la materia. Se encuentran disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones 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 en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar restos de FR y combinar del receptor e importar secuencias de un modo tal que se consigan las características de anticuerpo deseadas, tales como aumento de afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y específicamente implicados en la influencia de unión a antígeno.

Se contemplan diversas 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, se pueden generar anticuerpos humanos. En algunas realizaciones, se pueden producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, después de inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de unión (JH) de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana a tales ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de un desafío antigénico. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immun., 7: 33 (1993); y los documentos de Patente de Estados Unidos con n.ºs 5.591.669, 5.589.369, y 5.545.807.

Como alternativa, se puede usar 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 los repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donadores sin inmunizar. De acuerdo con esa técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de proteína de revestimiento mayoritario o minoritario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa 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 exhibe esas propiedades. De ese modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede llevar a cabo en una diversidad de formatos como se describe, por ejemplo, en Johnson *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de gen de V para la presentación en fagos. Véase, por ejemplo, Nature, 352: 624-628 (1991). Se puede construir un repertorio de genes de V a partir de donadores humanos sin inmunizar y se pueden aislar anticuerpos frente a diversos conjuntos de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo básicamente las técnicas que se describen en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Griffith *et al.*, EMBO J., 12: 725-734 (1993); y los documentos de Patente de Estados Unidos con n.ºs 5.565.332 y 5.573.905.

En ciertos casos, se pueden generar anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados *in vitro* como se describe, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con n.ºs 5.567.610 y 5.229.275.

E. Fragmentos de anticuerpo

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían a través de 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, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente usando células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las librerías de fagos de anticuerpos que se han discutido anteriormente. Como alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de células 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, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ del cultivo celular hospedador recombinante. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para los expertos en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena individual (scFv). Véanse, por ejemplo, el documento de Publicación PCT n.º WO 93/16185; y los documentos de Patente de Estados Unidos con n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser un anticuerpo lineal como se describe, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o diespecíficos.

F. Anticuerpos diespecíficos

Los anticuerpos diespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Algunos anticuerpos diespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes del mismo polipéptido de interés. Otros anticuerpos diespecíficos pueden combinar un sitio de unión por el polipéptido de interés con un sitio o sitios de unión por uno o más antígenos adicionales. Los anticuerpos diespecíficos se pueden preparar en forma de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos diespecíficos F(ab')₂).

Los métodos para preparar anticuerpos diespecíficos se conocen en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos diespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena pesada-cadena lineal de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (véase, por ejemplo, Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la diversidad aleatoria de las cadenas pesada y ligera de las inmunoglobulinas, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que es solo una tiene la estructura diespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se lleva a cabo habitualmente mediante cromatografía de afinidad. Se desvelan procedimientos similares en el

documento de Publicación PCT n.º WO 93/08829 y Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión
 5 deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) a secuencias de dominio constantes de inmunoglobulina. La
 fusión es preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al
 menos la parte de la bisagra, y las regiones CH2, y CH3. Es preferente tener una primera región constante de
 10 cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente 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 transfectan conjuntamente en un
 organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las propiedades mutuas de
 los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de
 15 polipéptido que se usan en la construcción proporcionan rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las
 secuencias codificantes de 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 mayores rendimientos o cuando las
 proporciones no son de especial importancia.

En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos diespecíficos están compuestos por una cadena
 pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-
 20 cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo.
 Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto diespecífico deseado de las combinaciones de
 cadena de inmunoglobulina no deseadas, dado que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina solo en
 una mitad de la molécula diespecífica proporciona una forma fácil de separación. Véanse, por ejemplo, el documento
 de Publicación PCT n.º WO 94/04690 y Suresh *et al.*, Meth. Enzymol., 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque que se describe en el documento de Patente de Estados Unidos n.º 5.731.168, la
 interfase entre un par de moléculas de anticuerpo se puede someter a ingeniería para maximizar el porcentaje de
 heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfase preferente comprende al menos
 una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplazan una o más
 30 cadenas laterales de aminoácido pequeñas de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más
 grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la
 cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo por reemplazo de las
 cadenas laterales de aminoácido grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto
 proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no
 35 deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos diespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los
 anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Los anticuerpos heteroconjugados
 se pueden preparar usando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes y las técnicas de reticulación
 adecuados se conocen en la técnica, y se desvelan, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos
 40 n.º 4.676.980.

También se conocen en la técnica técnicas adecuadas para generar anticuerpos diespecíficos a partir de fragmentos
 de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos diespecíficos usando unión química. En ciertos casos,
 los anticuerpos diespecíficos se pueden generar mediante un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se
 45 escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Brennan *et al.*, Science, 229: 81
 (1985)). Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol arsenito sódico para estabilizar
 ditiolos vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Se generan los fragmentos Fab' y a
 continuación se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se convierte a
 continuación en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro
 50 derivado Fab'-TNB para formar un anticuerpo diespecífico.

En algunas realizaciones, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse
 químicamente para formar anticuerpos diespecíficos. Por ejemplo, se puede producir una molécula F(ab')₂
 55 de anticuerpo diespecífico completamente humanizado mediante los métodos que se describen en Shalaby *et al.*, J.
 Exp. Med., 175: 217-225 (1992). Cada fragmento Fab' se segregó separadamente de *E. coli* y se sometió a
 acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo diespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo diespecífico directamente
 de cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos diespecíficos usando cremalleras de
 60 leucina. Véase, 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 partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión
 génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región de bisagra para formar monómeros y a
 continuación se oxidaron nuevamente para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede
 utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "dianticuerpo" descrita por Hollinger *et*
 65 *al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar
 fragmentos de anticuerpo diespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH)

conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por lo tanto, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan emparejarse con los dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión a antígeno. Otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo diespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de cadena individual (sFv) se describe en Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 60 (1991).

10 G. Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, se pueden producir anticuerpos en el interior de una célula hospedador aislada, en el espacio periplasmático de una célula hospedadora, o segregarse directamente de una célula hospedadora al medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, se retiran lugar los residuos formados por partículas, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *BioTech.*, 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se segregan en el espacio periplasmático de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los residuos celulares se pueden retirar por centrifugación. Cuando se segrega el anticuerpo al medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión se concentran generalmente usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración de Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas precedentes para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía sobre hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y del isotipo del dominio Fc de inmunoglobulina que esta presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar anticuerpos que se basan en 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 se recomienda 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 en la mayoría de los casos agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estireno-divinil)benceno permiten mayores caudales y menores tiempos de procesamiento que los que se consiguen con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker; Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También se encuentran disponibles otras técnicas para purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación en 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 poliácido aspártico), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se recupera.

Después de cualquier etapa o etapas de purificación preliminares, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución con un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, llevada a cabo preferentemente con bajas concentraciones salinas (por ejemplo, sal aproximadamente 0-0,25 M).

El experto en la materia entenderá que cualquier molécula de unión que tenga una función similar a un anticuerpo, por ejemplo, una molécula de unión o un compañero de unión que sea específico por uno o más analitos de interés en una muestra, se puede usar en los métodos y las composiciones de la presente invención. Algunos ejemplos de moléculas de tipo anticuerpo incluyen, pero no se limitan, anticuerpos de dominio, uni-anticuerpos, nano-anticuerpos, proteínas reactivas de antígeno de tiburón, avimeros, adnectinas, anticalmas, ligandos de afinidad, filómeros, aptámeros, afi-anticuerpos, trinectinas, y similares.

VII. Métodos de administración

De acuerdo con los métodos de la presente invención, los fármacos anticáncer que se describen en el presente documento se administran a un sujeto mediante cualquier medio conveniente conocido en la técnica. Los métodos de la presente invención se pueden usar para seleccionar un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer conocidos para el tratamiento de un cáncer (por ejemplo, una neoplasia hematológica) en un sujeto. Los métodos de la invención también se pueden usar para identificar la respuesta de un cáncer (por ejemplo, una neoplasia hematológica) en un sujeto al tratamiento con un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer. Además, los métodos de la invención se pueden usar para predecir la respuesta de un sujeto que tiene cáncer (por ejemplo, una neoplasia hematológica) al tratamiento con un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer. Además, los métodos de la presente invención se pueden usar para identificar a un sujeto que tiene cáncer (por ejemplo, una neoplasia hematológica) que es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer. Los expertos en la materia observarán que los fármacos anticáncer que se describen en el presente documento se pueden administrar solos o como parte de un enfoque terapéutico

combinado con quimioterapia convencional, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, y/o cirugía.

En ciertas realizaciones, el fármaco anticáncer comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa; un agente anti-proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; un vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular el crecimiento descontrolado de células anómalas tales como células cancerosas. En algunas realizaciones, el sujeto se trata 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 quinasa, agentes anti-proliferativos, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos, y vacunas a modo de ejemplo se han descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, los fármacos anticáncer que se describen en el presente documento se pueden co-administrar con agentes inmunoterapéuticos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunoestimulantes (por ejemplo, Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleuquina-2, alfa-interferón, etc.), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de pseudomonas, etc.), y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ^{111}In , ^{90}Y , o ^{131}I , etc.).

Los fármacos anticáncer se pueden administrar con un excipiente farmacéutico adecuado según sea necesario y se puede llevar a cabo a través de cualquiera de los modos de administración aceptados. De ese modo, la administración puede ser, por ejemplo, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intraarticular, parenteral, intraarterial, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intravesical, intratecal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal, o por inhalación. Por "administración conjunta" se pretende indicar que un fármaco anticancerígeno 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 a la terapia del fármaco anticáncer, un agente radioterapéutico, un agente terapéutico hormonal, un agente inmunoterapéutico, etc.).

Se puede administrar repetidamente una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco anticáncer, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más veces, o la dosis se puede administrar mediante infusión continua. La dosis puede tomar la forma de polvo sólido, semisólido, liofilizado, o formas de dosificación líquida, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, microgránulos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas, o similares, preferentemente en formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración sencilla de dosis precisas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco anticáncer calculada para producir el inicio, tolerabilidad, y/o efectos terapéuticos deseados, junto con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, se pueden preparar formas de dosificación más concentradas, a partir de las que se pueden producir a continuación formas de dosificación unitarias más diluidas. Las formas de dosificación más concentradas contendrán de ese modo básicamente más de, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces la cantidad del fármaco anticáncer.

Los expertos en la materia conocen los métodos para preparar tales formas de dosificación (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación incluyen por lo general un vehículo o excipiente farmacéuticamente convencional y pueden incluir además otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, mejoradores de la permeación de tejidos, solubilizantes, y similares. Los excipientes apropiados se pueden ajustar a la forma de dosificación y ruta de administración particulares mediante métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente).

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y ácidos poliacrílicos tales como Carbopoles, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden incluir además agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulgentes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo, etilo, y propilo (es decir, parabenos); agentes de ajuste de pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas de polímero biodegradable, dextrano, y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para administración oral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, pulverizaciones, grageas, polvos, o formulaciones de liberación

sostenida. Algunos excipientes adecuados para administración oral incluyen las calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares.

- 5 En algunas realizaciones, la dosis terapéuticamente eficaz toma la forma de una píldora, comprimido, o cápsula y, de ese modo, 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 similar; un aglutinante tal como un almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de la misma. Un fármaco anticáncer también se
10 puede formular en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

- Las formas de dosificación líquida se pueden preparar por disolución o dispersión de un fármaco anticáncer y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, cloruro sódico al 0,9 % en p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar
15 una solución o suspensión, por ejemplo, para administración oral, tópica, o intravenosa. Un fármaco anticáncer también se puede formular en un enema de retención.

- Para administración tópica, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, jaleas, soluciones, suspensiones, pomadas, y parches transdérmicos. Para administración por
20 inhalación, el fármaco anticáncer se puede suministrar en forma de un polvo seco o en forma líquida mediante un nebulizador. Para administración parenteral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles. Preferentemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

- 25 La dosis terapéuticamente eficaz también se puede proporcionar en una forma liofilizada. Tales formas de dosificación pueden incluir un tampón, por ejemplo, bicarbonato, para reconstitución antes de administración, o el tampón puede estar incluido en la forma de dosificación liofilizada para reconstitución, por ejemplo, con agua. La forma de dosificación liofilizada puede comprender además un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo, epinefrina. La forma de dosificación liofilizada se puede proporcionar en una jeringa, envasada opcionalmente junto con el tampón
30 para reconstitución, de un modo tal que la forma de dosificación reconstituida se pueda administrar inmediatamente a un sujeto.

- Un sujeto también se puede monitorizar a intervalos de tiempo periódicos para evaluar la eficacia de un cierto régimen terapéutico. Por ejemplo, los estados de activación de ciertas proteínas de fusión oncogénicas y/o
35 moléculas de transducción de señales pueden cambiar basándose en el efecto terapéutico del tratamiento con uno o más de los fármacos anticáncer que se describen en el presente documento. El sujeto se puede monitorizar para evaluar la respuesta y comprensión de los efectos de ciertos fármacos o tratamientos en un enfoque individualizado. Además, los sujetos que responden inicialmente a un fármaco anticáncer o combinación de fármacos anticáncer específicos pueden llegar a ser resistentes al fármaco o la combinación de fármacos, lo que indica que estos sujetos
40 han desarrollado resistencia a fármaco adquirida. Estos sujetos se pueden discontinuar de la terapia en curso y se puede prescribir un tratamiento alternativo de acuerdo con los métodos de la presente invención.

- En ciertos aspectos, los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar junto con paneles de marcadores de expresión génica que predicen la probabilidad de prognosis y/o reaparición de cáncer en diversas
45 poblaciones. Estos paneles génicos pueden ser útiles para identificar individuos que es poco probable que experimenten reaparición y, de ese modo, poco probable que se beneficien de quimioterapia adyuvante. Los paneles de expresión se pueden usar para identificar sujetos que pueden evitar de forma segura quimioterapia adyuvante, sin afectar de forma negativa los resultados exentos de enfermedad y de supervivencia globales.

- 50 Además, en ciertos otros aspectos, los métodos que se describen en el presente documento se pueden usar junto con paneles de marcadores de expresión génica que identifican los tumores originales de cánceres de causa primaria desconocida (CUP). Estos paneles génicos pueden ser útiles en la identificación de sujetos con cáncer metastásico que se beneficiarían de una terapia consistente con la que se da a los sujetos diagnosticados inicialmente con cáncer. Algunos sistemas adecuados incluyen, pero no se limitan a, el ensayo Avira CancerTYPE
55 ID, un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el sitio primario de origen de 39 tipos de tumor; y el Ensayo de Origen Pathwork[®] Tissue, que mide la expresión de más de 1600 genes en una micromatriz y compara una "firma" de expresión génica de tumores frente a los de 15 tipos de tejido conocidos.

VIII. Ejemplos

- 60 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Detección de celda individual usando un ELISA de micromatriz de detector doble de proximidad con amplificación de señal de tiramida

- 65 Este ejemplo ilustra un ELISA de sándwich de micromatriz de detector doble de proximidad, alto rendimiento,

multiplexado, que tiene un intervalo dinámico superior que es adecuado para analizar los estados de activación de proteínas de fusión y moléculas de transducción de señales en extractos celulares preparados a partir de células aisladas. En realizaciones en particular, el ensayo de proximidad está en el formato de una micromatriz direccionable.

- 5 1) Se imprimió anticuerpo de captura en un portaobjetos FAST de 16 pocillos (Whatman Inc.) con una dilución seriada de 1 mg/ml a 0,004 mg/ml. Como alternativa, se puede usar una serie de dilución de 2 veces de cada anticuerpo de captura (0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, y 0,0625 mg/ml), y se pueden realizar aplicaciones puntuales dobles y cuádruples para cada dilución del anticuerpo. Para detectar la proteína de fusión BCR-ABL, un anticuerpo de captura a modo de ejemplo comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-BCR.
- 10 2) Después de secar durante una noche, el portaobjetos se bloqueó con tampón de bloqueo Whatman.
- 3) Se añadieron 80 µl de lisado celular a cada pocillo con una dilución seriada 10 veces. El pocillo se incubó durante dos horas a temperatura ambiente.
- 15 4) Después de seis lavados con TBS-Tween, se añadieron 80 µl de anticuerpos de detección para el ensayo de proximidad diluidos en TBS-Tween/BSA al 2 % /FBS al 1 % a los portaobjetos. Para detectar la proteína de fusión BCR-ABL, algunos anticuerpos de detección a modo de ejemplo incluyen: (1) un anticuerpo monoclonal o policlonal anti-ABL directamente conjugado a glucosa oxidasa (GO); y (2) un anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce ABL fosforilado directamente conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP). La incubación fue durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 20 5) Como alternativa, la etapa de detección puede utilizar un conjugado de biotina del anticuerpo que reconoce ABL fosforilado. En estos casos, después de seis lavados se incluyó una etapa secuencial adicional de incubación con estreptavidina-HRP durante 1 hora.
- 25 6) Como alternativa, la etapa de detección puede utilizar un conjugado de GO mediado por oligonucleótido del anticuerpo anti-ABL. Se puede usar el conjugado directamente o el conjugado unido a biotina-estreptavidina (SA) de HRP al anticuerpo de ABL fosforilado.
- 6) Para la amplificación de 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.
- 30 7) Se añadieron 80 µl de SA-Alexa 555 y se incubaron durante 30 min. El portaobjetos se lavó a continuación dos veces, se secó durante 5 minutos, y se escaneó en un escáner de micromatriz (Perkin-Elmer, Inc.).

El formato de micromatriz de ensayo de proximidad que se describe en el presente documento exhibe de forma ventajosa un fondo muy bajo (por ejemplo, en comparación con ensayos de dos anticuerpos) debido al aumento de especificidad obtenido por detección de la proximidad entre los dos anticuerpos de detección.

35 **Ejemplo 2. Generación de perfiles de activación para la selección de fármaco**

Las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden aplicar para la selección de fármaco para el tratamiento de cáncer. Como un ejemplo no limitante, la presente invención encuentra utilidad en la identificación de la presencia y/o la actividad de una o una pluralidad de las proteínas de fusión oncogénicas asociadas a tumores malignos hematológicos con el fin de proporcionar el tratamiento apropiado para pacientes con estos tipos de cáncer. Un protocolo habitual supone la generación de dos perfiles, un perfil de activación de referencia y un perfil de activación de ensayo, que a continuación se comparan para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento de fármaco particular (véase, Figura 2).

45 **Perfil de activación de referencia**

Para obtener un perfil de activación de referencia, se obtiene una muestra de sangre de un paciente que tiene un tipo específico de cáncer (por ejemplo, leucemia tal como CML) antes del tratamiento con fármaco anticáncer. Se aíslan células tumorales de la muestra de sangre usando, por ejemplo, cualquiera de las técnicas que se describen con mayor detalle en el presente documento. Las células aisladas se pueden estimular *in vitro* con uno o más factores de crecimiento. Las células estimuladas se lisan a continuación para producir un extracto celular. El extracto celular se aplica a una matriz direccionable que contiene una serie de dilución de un panel de anticuerpos de captura específicos para una o una pluralidad de las proteínas de fusión oncogénicas (solas o en combinación con una o una pluralidad de moléculas de transducción de señales) cuyos estados de activación pueden 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 apropiados (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación) para determinar el estado de activación de cada analito de interés. De ese modo se genera un perfil de activación de referencia que proporciona los estados de activación de analitos específicos tales como proteínas de fusión oncogénicas en el cáncer del paciente en ausencia de cualquier fármaco anticáncer.

60 **Perfil de activación de ensayo**

65 Para obtener un perfil de activación de ensayo, se obtiene una segunda muestra de sangre del paciente que tiene el tipo específico de cáncer (por ejemplo, leucemia tal como CML) antes del tratamiento con fármaco anticáncer o

después de la administración de un fármaco anticáncer (por ejemplo, en cualquier momento en el curso del tratamiento del cáncer). Se aíslan células tumorales de la muestra de sangre. Si las células aisladas se obtienen a partir de un paciente que no ha recibido tratamiento con un fármaco anticáncer, las células aisladas se incuban con los fármacos anticáncer que fijan como diana una o más de las proteínas de fusión oncogénicas activadas y/o las moléculas de transducción de señales determinadas a partir del perfil de activación de referencia que se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, si se determina a partir del perfil de activación de referencia que se activa la proteína de fusión BCR-ABL, entonces las células se pueden incubar con imatinib (Gleevec®). Las células aisladas se pueden estimular a continuación de *in vitro* con uno o más factores de crecimiento. Las células aisladas se lisan a continuación para producir un extracto celular. El extracto celular se aplica a la matriz direccionable y se llevan a cabo la detección individual o los ensayos de proximidad para determinar el estado de activación de cada analito de interés. Se genera de ese modo un perfil de activación de ensayo para el paciente que proporciona los estados de activación de los analitos específicos tales como proteínas de fusión oncogénicas en el cáncer del paciente en presencia de fármacos anticáncer específicos.

15 **Selección de fármaco**

Se determina que los fármacos anticáncer son adecuados o inadecuados para el tratamiento del cáncer del paciente por comparación del perfil de activación de ensayo con el perfil de activación de referencia. Por ejemplo, si el tratamiento con fármaco hace que la mayoría o la totalidad de las proteínas de fusión oncogénicas y/o las moléculas de transducción de señales estén básicamente 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, entonces se determina que el tratamiento es adecuado para el cáncer del paciente. En tales casos, el tratamiento se inicia con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que no ha recibido terapia de fármaco o se continúa el tratamiento posterior con el fármaco anticáncer adecuado en un paciente que ya ha recibido el fármaco. Sin embargo, si el tratamiento de fármaco se considera inadecuado para el tratamiento del cáncer del paciente, se seleccionan diferentes fármacos y se usan para generar un nuevo perfil de activación de ensayo, que a continuación se compara con el perfil de activación de referencia. En tales casos, el tratamiento se inicia con un fármaco anticáncer adecuado en un paciente que no ha recibido terapia de fármaco o se cambia el tratamiento posteriormente a un fármaco anticáncer adecuado en un paciente que en ese momento está recibiendo el fármaco inadecuado.

El protocolo que se describe en este ejemplo también es útil para identificar pacientes que son resistentes a terapia con un inhibidor de tirosina quinasa tal como imatinib debido a mutaciones en la proteína quinasa diana (por ejemplo, BCR-ABL), no cumplimiento con el régimen terapéutico, y/o administración de una dosis de fármaco subóptima.

35 **Ejemplo 3. Proteínas de fusión oncogénicas a modo de ejemplo asociadas con cáncer**

Este ejemplo proporciona un listado no exhaustivo de translocaciones en tumores humanos que causan la formación de proteínas de fusión oncogénicas y sus neoplasias asociadas.

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

45 AML: translocación de una parte del cromosoma 8 al cromosoma 21 La oncoproteína quimérica resultante es RUNX1/ETO. Otra translocación t(12;15)(p13;q25) da como resultado la oncoproteína quimérica TEL/TrkC (quinasa).

CML: el cromosoma Filadelfia es una translocación que da como resultado BCR/ABL (quinasa).

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

ALL: Proteínas oncogénicas quiméricas:

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

DFSP: Aproximadamente un 95 % de los tumores DFSP tienen la translocación cromosómica t(17;22), que da como resultado la oncoproteína quimérica COL1A1/PDGF (se une a y activa PDGFR).

5 Leucemia promielocítica aguda: una translocación indicada como t(15; 17)(q22;q 12). La oncoproteína quimérica resultante es RARA/PML (proteína del complejo de transcripción).

10 Leucemia linfoblástica aguda de pro-linfocitos B: translocación t(17; 19), que da como resultado la oncoproteína quimérica E2A/HLF (inhibidor de la apoptosis).

Leucemia pre-linfocitos B aguda: translocación t(1;19). La oncoproteína quimérica es E2A/Pbx1 (sustrato de quinasa).

15 Rabdomiosarcoma: translocación de t(2;13)(q35;q14), que da como resultado la oncoproteína quimérica PAX3/FKHR (factor de transcripción).

20 Una neoplasia de tejido blando de niños muy pequeños: reordenación de t(12;15)(p13;q25) que da como resultado la siguiente oncoproteína quimérica: proteína tirosina quinasa ETV6/NTRK3 (quinasa).

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

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

25 Los ejemplos adicionales de translocaciones en tumores humanos que causan la formación de las proteínas de fusión oncogénicas y sus neoplasias asociadas:

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

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

30 **Ejemplo 4. Inmunoensayo Mediado por Proximidad para la Detección de Niveles Totales y Activados de Proteínas de Fusión Oncogénicas.**

Introducción

35 El oncogén BCR-ABL se forma mediante una translocación del gen ABL normal situado en el brazo largo del cromosoma 9 a la parte N-terminal del gen BCR situado en el brazo largo del cromosoma 22 para formar el

cromosoma Filadelfia. Dependiendo de dónde se corte y empalme el gen ABL translocado sobre el extremo N-terminal del gen BCR, se producen diferentes longitudes de los productos génicos BCR-ABL, siendo el más prevalente el producto génico BCR-ABL p210 como el oncogén que causa CML y un subconjunto de ALL. También se producen otros productos génicos adicionales, tales como BCR-ABL p185 y p230. En particular, el producto

5 génico BCR-ABL p210 es responsable de causar AML. Esta proteína contiene 1790 aminoácidos y está compuesta por un dominio de oligomerización (OLI) de BCR en el extremo N-terminal, seguido del dominio de S/T quinasa de BCR, una intercalación de secuencia de aminoácidos de BCR que no está presente en BCR normal, seguido de los dominios SH3, SH2 e Y quinasa de ABL así como el dominio C-terminal rico en prolina de ABL.

10 Antecedentes clínicos

Aunque la mayoría de los pacientes con leucemia mielógena crónica (CML) en la fase crónica responden bien a imatinib, algunos pacientes no consiguen el punto final deseable, y otros pueden perder finalmente la respuesta o son intolerantes. Con respecto a un tratamiento de 400 mg/día de imatinib (Gleevec): existe una respuesta

15 citogenética completa (CCyR) en un 70-80 % de pacientes; existe una pérdida de CCyR con una tasa de un 4 a un 7 %/año en los primeros 3 años y a continuación de un 1 a un 2 %/año después de esto; la tasa de supervivencia global después de 7 años es un 90 %, la tasa de supervivencia exenta de sucesos después de 7 años es un 81 %; y la tasa de recaída es aproximadamente un 30 % en 5 años. Existe una mejor respuesta al tratamiento de 800 mg/día de imatinib (Gleevec) (CCyR = 95 %; Tasa de recaída = 5 %), pero tal dosis de imatinib es también más tóxica.

20 Nilotinib tiene una eficacia similar a 800 mg/día de imatinib, pero es más tóxico que imatinib.

La inhibición de BCR-ABL completa produce mejor respuesta a Gleevec, pero la inhibición de BCR-ABL incompleta da como resultado una recaída a Gleevec. Por lo tanto, la detección en tiempo real del nivel de expresión y el grado de activación de BCR-ABL podría beneficiar a los pacientes con CML con terapia dirigida mediante el ajuste de la

25 dosis del fármaco para inhibir de forma eficaz la diana mientras se minimiza la toxicidad. Por ejemplo, los pacientes con inactivación completa de 400 mg/día de Gleevec se podrían situar en una dosis mayor (por ejemplo, 800 mg/día) más pronto para asegurar la respuesta.

30 Reto diagnóstico

Los niveles altos de línea basal de BCR de longitud completa y ABL hacen muy difícil detectar la proteína de fusión BCR-ABL relativamente baja en abundancia. Además, los ensayos actuales que detectan los niveles de fosforilación de BCR-ABL no tienen sensibilidad para detectar fosforilación en muestras de sangre clínicas. Además, los anticuerpos frente a proteínas de fusión tales como BCR-ABL no son muy específicos para múltiples variantes de la

35 proteína de fusión.

Nuevos ensayos de detección de BCR-ABL

La Figura 3A ilustra un ensayo (300) de proximidad a modo de ejemplo para detectar la presencia (nivel total) y/o el estado de activación (nivel de fosforilación) de una proteína de fusión oncogénica tal como BCR-ABL (310). La

40 Figura 3B ilustra una realización alternativa (400) de los ensayos de proximidad de la presente invención para detectar la presencia (nivel total) y/o el estado de activación (nivel de fosforilación) de BCR-ABL (410) usando anticuerpos de unión.

45 Algunos ejemplos no limitantes de anticuerpos adecuados para su uso en los métodos para medir BCR-ABL total y/o niveles de proteínas activadas como se ilustra en las Figuras 3A-3B incluyen los que se han expuesto anteriormente en la Tabla 1.

Resultados

50 La Figura 4 ilustra la señal de BCR-ABL en células K562 (es decir, células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana) después de la retirada del BCR libre de longitud completa usando un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa conjugado a perlas de acuerdo con el ensayo de proximidad a modo de ejemplo que se representa en la Figura 3A. En particular, la Figura 4 demuestra

55 que la señal de BCR-ABL no se ve afectada por la retirada de BCR libre de una muestra de paciente usando el nuevo ensayo de proximidad de la presente invención.

La Figura 5 ilustra la señal de BCR en células K562 después de la retirada del BCR libre usando un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa conjugado a perlas de acuerdo con el

60 ensayo de proximidad a modo de ejemplo que se representa en la Figura 3A. Como se muestra en la Figura 5, una disminución en la señal de BCR a 10.000 células demuestra que solo se retira BCR usando el nuevo ensayo de proximidad de la presente invención.

La Figura 6 ilustra la detección de los niveles total y fosforilado de BCR-ABL en células K562 usando el ensayo de

65 proximidad a modo de ejemplo que se representa en la Figura 3A.

Conclusión

Este ejemplo demuestra que los ensayos de proximidad a modo de ejemplo que se representan en las Figuras 3A y 3B para detectar la presencia y/o el estado de activación de BCR-ABL son ventajosos por al menos las siguientes razones: (1) se pueden retirar proteínas BCR de longitud completa de una muestra de paciente tal como sangre o aspirado de médula ósea usando una etiqueta de reducción específica para la región C-terminal de BCR; (2) una vez se retira BCR de longitud completa de la muestra del paciente, los anticuerpos de captura específicos para la región N-terminal de BCR pueden capturar proteínas de fusión BCR-ABL; y (3) una vez se capturan proteínas de fusión BCR-ABL, sus niveles de expresión y activación se pueden detectar con alta sensibilidad a través de canalización de proximidad, en la que solo se genera una señal detectable individual que correlaciona con los niveles de proteína BCR-ABL total o activada después de la unión de los tres anticuerpos, dando como resultado un aumento de la especificidad del ensayo, menor fondo, y una detección simplificada.

Ejemplo 5. Detección de los niveles total y activado de BCR-ABL sin interferencia de BCR y/o ABL de longitud completa

Este ejemplo proporciona datos experimentales adicionales que demuestran las ventajas de los ensayos de proximidad a modo de ejemplo que se representan en las Figuras 3A y 3B para detectar la presencia (nivel total) y/o el estado de activación (nivel de fosforilación) de BCR-ABL. En una realización en particular, se retiran proteínas BCR de longitud completa a partir de un extracto de células (por ejemplo, células de línea blanca sanguínea malignas tales como células de leucemia) obtenidas a partir de una muestra de paciente o a partir de un extracto de células obtenido a partir de una línea celular (por ejemplo, una línea celular de leucemia) usando una etiqueta de reducción específica para la región C-terminal de BCR. Una vez se retira BCR de longitud completa del extracto celular, los anticuerpos de captura específicos para la región N-terminal de BCR pueden capturar las proteínas de fusión BCR-ABL. Una vez se capturan las proteínas de fusión BCR-ABL, sus niveles de expresión y activación se pueden detectar con alta sensibilidad a través de canalización de proximidad, en la que solo se genera una señal detectable individual que correlaciona con los niveles de proteína BCR-ABL total o activada después de la unión de los tres anticuerpos, dando como resultado de forma ventajosa un aumento de la especificidad del ensayo, menor fondo, y una detección simplificada.

La Figura 7 ilustra el nivel de fosforilación ("BCR-ABL Fosfo") y la cantidad total ("BCR-ABL Total") de BCR-ABL detectado en células K562 (es decir, células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana) después de la retirada del BCR libre de longitud completa usando un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa conjugado a perlas de acuerdo con el ensayo de proximidad a modo de ejemplo que se representa en la Figura 3A. En particular, las Figuras 7A y 7B muestran que las señales de BCR-ABL fosforilada y total no cambiaron después de poner en contacto un extracto de células K562 con anticuerpos específicos para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa acoplados a perlas para retirar la proteína libre de BCR usando el nuevo ensayo de proximidad de la presente invención. La Figura 7C ilustra que de hecho se retiró BCR libre de longitud completa del extracto celular después del tratamiento con perlas acopladas a un anticuerpo C-terminal de BCR.

La Figura 8 proporciona otra ilustración de la señal de BCR-ABL fosforilada en células K562 después de la retirada del BCR libre usando un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa conjugado a perlas de acuerdo con el ensayo de proximidad a modo de ejemplo que se representa en la Figura 3A. En particular, la Figura 8A proporciona una comparación de la micromatriz de la señal de BCR-ABL fosforilada en lisados de células K562 con o sin retirada de BCR de longitud completa ("Perlas no tratadas" = BCR no retirada con respecto a "Perlas tratadas" = BCR retirada con perlas que contiene un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa conjugado con la misma). La Figura 8B proporciona una representación gráfica de los datos de la micromatriz con Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) como una función del índice celular. Estas figuras demuestran que la señal de BCR-ABL fosfo no cambió después de la retirada de BCR de longitud completa a partir de un extracto de células K562 usando el nuevo ensayo de proximidad de la presente invención.

La Figura 9 proporciona otra ilustración de la señal de BCR-ABL total en células K562 después de la retirada del BCR libre usando un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa conjugado a perlas de acuerdo con el ensayo de proximidad a modo de ejemplo que se representa en la Figura 3A. En particular, la Figura 9A proporciona una comparación de la micromatriz de la señal de BCR-ABL total detectada en lisados de células K562 con o sin retirada de BCR de longitud completa ("Perlas no tratadas" = BCR no retirada con respecto a "Perlas tratadas" = BCR retirada con perlas que contiene un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa conjugado con la misma). La Figura 9B proporciona una representación gráfica de los datos de la micromatriz con Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) como una función del índice celular. Estas figuras demuestran que la señal de BCR-ABL total no cambió después de la retirada de BCR de longitud completa a partir de un extracto de células K562 usando el nuevo ensayo de proximidad de la presente invención.

La Figura 10 proporciona otra ilustración de la retirada de BCR libre de longitud completa a partir de un extracto de

células K562 después de poner en contacto el extracto celular con perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR. En particular, la Figura 10A proporciona una comparación de micromatriz de la señal de BCR total detectada en lisados de células K562 con o sin retirada de BCR de longitud completa ("Perlas no tratadas" = BCR no retirada con respecto a "Perlas tratadas" = BCR retirada con perlas que contiene un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa conjugado con la misma). La Figura 10B proporciona una representación gráfica de los datos de la micromatriz con Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU) como una función del índice celular. Estas figuras demuestran que BCR de longitud completa prácticamente se eliminó del extracto celular cuando se trató con perlas que contenían un anticuerpo específico para el extremo C-terminal de BCR de longitud completa. De hecho, los extractos celulares que contenían, por ejemplo, menos de 1000 células, no produjeron ninguna señal de BCR que estuviera significativamente por encima del fondo (0 células) cuando se incubaron con perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR.

La Figura 11 ilustra que BCR libre de longitud completa y las proteínas ABL, pero no la proteína de fusión BCR-ABL, están presentes en las células sanguíneas de la línea blanca (WBC). La Figura 12 muestra que la BCR libre de longitud completa presente en las WBC inhibía la señal de BCR-ABL fosfo en extractos de células K562 cuando tales extractos de células K562 se fijaron con extractos de WBC. La Figura 13 ilustra la señal de BCR-ABL total en células K562 fijadas con extractos de WBC después de la retirada del BCR libre usando un anticuerpo específico para la región carboxilo-terminal de BCR de longitud completa conjugado a perlas. En particular, la Figura 13A muestra que la señal de BCR libre se saturó cuando los extractos de células K562 se fijaron con extractos de WBC. Después de tratamiento con perlas acopladas a anticuerpo C-terminal de BCR, se retiró el BCR libre. La Figura 13B muestra que la señal de BCR-ABL no cambió con o sin tratamiento de perlas en el mismo experimento.

En algunas realizaciones, la proteína ABL de longitud completa se puede retirar adicional o alternativamente del extracto de células (por ejemplo, células sanguíneas de línea blanca malignas tales como células de leucemia) obtenidas a partir de una muestra de paciente o a partir del extracto de células obtenido a partir de una línea celular (por ejemplo, una línea celular de leucemia) antes de la captura y la detección de la expresión y/o la activación de BCR-ABL mediante el uso de una etiqueta de reducción específica para la región amino terminal de ABL de longitud completa. Un ejemplo no limitante de tal etiqueta de reducción es una perla a la que se une un anticuerpo específico para la región N-terminal de ABL de longitud completa.

Ejemplo 6. Detección de los niveles total y activado de BCR-ABL en células tratadas con inhibidores de la actividad de quinasa de BCR-ABL

Este ejemplo demuestra que los inhibidores de BCR-ABL tales como imatinib (Gleevec[®]), nilotinib (Tasigna[®]), y dasatinib (Sprycel[®]) inhibieron de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, la fosforilación), pero no la expresión (es decir, los niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562 (es decir, células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana).

En particular, las Figuras 14A y 14B ilustran que el inhibidor de BCR-ABL imatinib (Gleevec[®]) inhibía de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, la fosforilación), pero no la expresión (es decir, los niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562. La Figura 14C muestra la proporción fosfo/total de BCR-ABL después de inhibición con imatinib, que correlaciona con el porcentaje de inhibición de la señal de BCR-ABL fosfo con tratamiento con imatinib.

La Figuras 15A y 15B ilustran que el inhibidor de BCR-ABL nilotinib (Tasigna[®]) inhibía de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, la fosforilación), pero no la expresión (es decir, los niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562. La Figura 15C muestra la proporción fosfo/total de BCR-ABL después de inhibición con nilotinib, que correlaciona con el porcentaje de inhibición de la señal de BCR-ABL fosfo con tratamiento con nilotinib.

La Figuras 16A y 16B ilustran que el inhibidor de BCR-ABL dasatinib (Sprycel[®]) inhibía de forma dependiente de la dosis la activación (es decir, la fosforilación), pero no la expresión (es decir, los niveles totales), de proteína BCR-ABL en células K562. La Figura 16C muestra la proporción fosfo/total de BCR-ABL después de inhibición con dasatinib, que correlaciona con el porcentaje de inhibición de la señal de BCR-ABL fosfo con tratamiento con dasatinib.

Ejemplo 7. Detección de los niveles total y activado del sustrato de BCR-ABL CRKL en diversas líneas celulares de cáncer

Este ejemplo demuestra la detección de los niveles total y activado (fosforilado) del sustrato de BCR-ABL CRKL que se determina mediante un ELISA de sándwich. En otras realizaciones, la presencia y/o el estado de activación de un sustrato de BCR-ABL tal como CRKL se puede medir usando un ensayo de proximidad tal como un Inmunoensayo de Proximidad Colaborativa (COPIA) que se describe en el documento de Solicitud de PCT con n.º PCT/US2010/042182, presentado el 15 de julio de 2010, y los documentos de Publicación de Patente de Estados Unidos con n.ºs 20080261829, 20090035792, y 20100167945.

La Figura 17 ilustra que CRKL está tanto presente como activado (es decir, fosforilado) en células K562 (es decir,

células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana). La Figura 18 muestra que CRKL está presente en células A431 (es decir, células de una línea celular de carcinoma epidermoide humano) y está activado (es decir, fosforilado) después de tratamiento con EGF. La Figura 19 muestra que CRKL está presente en células T47D (es decir, células de una línea celular de tumor epitelial de mama ductal humano) pero no está activado (es decir, fosforilado) después de tratamiento con EGF. La Figura 20 muestra que CRKL está presente en células T47D y está activado (es decir, fosforilado) a niveles bajos después del tratamiento con heregulina (HRG). La Figura 21 muestra que CRKL está presente en células MCF-7 (es decir, células de una línea celular de adenocarcinoma de mama humano) y está activado (es decir, fosforilado) a niveles bajos después del tratamiento con heregulina (HRG). La Figura 22 ilustra la presencia de CRKL activado (es decir, fosforilado) en las células sanguíneas de la línea blanca (WBC) de muestras de paciente, siendo diferente el nivel de activación entre los donantes.

Ejemplo 8. Detección de los niveles total y activado del sustrato de BCR-ABL JAK2 en diversas líneas celulares de cáncer

Este ejemplo demuestra la detección de niveles activados (fosforilados) del sustrato de BCR-ABL JAK2 que se determina mediante un ELISA de sándwich. En otras realizaciones, la presencia y/o el estado de activación de un sustrato de BCR-ABL tal como JAK2 se puede medir usando un ensayo de proximidad tal como un Inmunoensayo de Proximidad Colaborativa (COPIA) que se describe en el documento de Solicitud de PCT con n.º PCT/US2010/042182, presentado el 15 de julio de 2010, y los documentos de Publicación de Patente de Estados Unidos con n.ºs 20080261829, 20090035792, y 20100167945.

La Figura 23 ilustra que JAK2 está activado (es decir, fosforilado) en células K562 (es decir, células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana) y células A431 (es decir, células de una línea celular de carcinoma epidermoide humano).

Ejemplo 9. Aislamiento de Células De Sangre Sin Dilución de Fármaco Anticáncer.

Este ejemplo demuestra la recuperación de células K562 (es decir, células de una línea celular de leucemia mielógena crónica humana) de sangre con adiciones de células K562 usando captura en perla magnética con anticuerpos anti-CD45, seguido de la preparación de un lisado de células K562 y determinación de la expresión y/o estado de activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo, BCR-ABL), sustratos de las mismas, rutas de las mismas, o combinaciones de las mismas. Este ejemplo también demuestra la recuperación de glóbulos blancos de muestras de sangre del paciente usando captura en perla magnética con anticuerpos anti-CD45 y/o anti-CD15, seguido de la preparación de un lisado celular y determinación de la expresión y/o estado de activación de una o más proteínas de fusión oncogénicas (por ejemplo, BCR-ABL), sustratos de las mismas, rutas de las mismas, o combinaciones de las mismas. Al eliminar la necesidad de una etapa de lavado después del aislamiento celular, los métodos que se describen en el presente documento son ventajosos porque las células de interés se pueden recuperar de la sangre sin cambiar la concentración intracelular de un fármaco anticáncer tal como un inhibidor de tirosina quinasa. Como tal, los métodos descritos en el presente ejemplo son contrarios a la práctica aceptada en la técnica de lavado de las células después del aislamiento (por ejemplo, lavado de células unidas a perla), y proporcionan lisados celulares de células recuperadas sin dilución sustancial de un fármaco anticáncer tal como un inhibidor de tirosina quinasa (por ejemplo, Gleevec[®], Tasigna[®], Sprycel[®], etc.) dentro de las células.

Recuperación de Células K562 de 1 ml de Sangre Usando Dynabeads CD45

1. Preparar el Tampón 1

- 1.1 Añadir 500 mg de BSA a 500 ml de PBS
- 1.2 Añadir 2 ml de EDTA 0,5 M

2. Preparar la Sangre y Hacer Adiciones con Células K562

- 2.1 Obtener 10 ml de sangre completa del donante
- 2.2 Diluir con una dilución a 1:1 de sangre con el Tampón 1
- 2.3. Hacer un recuento celular de células K562 usando el CellCounter automatizado
- 2.4 Añadir 5e6, 1e6, 0,1e6, y 0 células K562 por separado en 1 ml de sangre diluida para cada concentración

3. Lavar DynaBeads (n.º de Cat. de Invitrogen 111.53D)

- 3.1 Transferir 100 µl de perlas para cada 1e7 células en un tubo Eppendorf de 1,5 ml
- 3.2 Añadir 1 ml de Tampón 1 y mezclar con cuidado
- 3.3 Colocar el tubo en el imán durante 1 min.
- 3.4 Retirar el sobrenadante
- 3.5 Retirar el tubo del imán y volver a suspender en cantidades iguales de Tampón 1 como el volumen de partida de perlas transferidas

4. Aislamiento Celular

4.1 Añadir 100 µl de perlas lavadas a cada muestra de sangre con adiciones de K562.

5 4.2 Incubar las muestras en un aparato giratorio en una habitación fría (o temperatura ambiente) durante 20 min, 2 h o 1 h

4.3. Colocar las muestras en el imán y retirar el sobrenadante

5. Preparación del Lisado Celular

10 5.1 Añadir 1 ml de Tampón de Lisis frío a las perlas unidas con 5e6 células K562

5.2 Añadir 500 µl de Tampón de Lisis a las perlas unidas con 1e6 células K562

5.3 Añadir 100 µl de Tampón de Lisis a las perlas unidas con 0,1e6 células K562

15 5.4. Someter a agitación vorticial y colocar en hielo durante 20'; someter a agitación vorticial de forma intermitente

5.5 Centrifugar durante 15' a velocidad máx. a 4 grados

5.6 Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf para desarrollar la micromatriz, por ejemplo, mediante la realización del inmunoensayo mediado por proximidad que se describe en el presente documento

Aislamiento de Células de CML de Muestra de Sangre del Paciente Usando Dynabeads CD45 y/o CD15

20

1. Preparar el Tampón 1

1.1 Añadir 500 mg de BSA a 500 ml de PBS

1.2 Añadir 2 ml de EDTA 0,5 M

25

2.2. Preparar la Sangre del Paciente

2.1 Obtener 2-3 ml of sangre completa del paciente usando EDTA (o Heparina) como anticoagulante

2.2 Añadir o no añadir inhibidores de proteasa

30

3. Lavar DynaBeads (n.º de Cat. de Invitrogen 111.53D)

3.1 Transferir 100 µl (200 µl, 300 µl) de perlas para cada 1 ml de muestra de sangre en un tubo Eppendorf de 1,5 ml

35

3.2 Añadir 1 ml de Tampón 1 y mezclar con cuidado

3.3 Colocar el tubo en el imán durante 1 min.

3.4 Retirar el sobrenadante

3. 5 Retirar el tubo del imán y volver a suspender en 100 µl de Tampón 1 como el volumen de partida de perlas transferidas

40

4. Aislamiento Celular

4.1 Añadir los 100 µl de perlas lavadas a 1 ml de muestra de sangre en un tubo Eppendorf de 1,5 ml

45

4.2 Incubar las muestras en un aparato giratorio en una habitación fría (o temperatura ambiente) durante 20 min, 2 h o 1 h

4.3 Colocar las muestras en el imán y retirar el sobrenadante

5. Preparación de Lisado Celular

50

5.1 Añadir 100 µl de Tampón de Lisis a las perlas unidas con células

5.2 Someter a agitación vorticial y colocar en hielo durante 20'; someter a agitación vorticial de forma intermitente

5.3 Centrifugar durante 15' a velocidad máx. a 4 grados

55

5.4 Transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf para desarrollar la micromatriz, por ejemplo, mediante la realización del inmunoensayo mediado por proximidad que se describe en el presente documento.

La Figura 24 ilustra que la BCR-ABL fosforilada se puede detectar y medir en lisados celulares preparados a partir de células K562 aisladas de sangre usando perlas magnéticas anti-CD45. En particular, el anticuerpo 4G10 (Millipore), que se une al resto de fosfo-tirosina en la porción Abl de la proteína de fusión, se usó para detectar los niveles fosforiladas de BCR-ABL. Un ensayo similar se puede realizar en lisados celulares preparados a partir de glóbulos blancos (por ejemplo, células de leucemia mielógena crónica (CML)) aisladas de la sangre de muestras del paciente usando perlas magnéticas anti-CD45 y/o anti-CD 15 para detectar y medir la presencia y/o nivel de BCR-ABL fosforilada.

60

Ejemplo 10. Detección de los Niveles Tanto de Proteína de Fusión Oncogénica Total como de Proteína de Longitud Completa Nativa Total en Muestras del Paciente

5 Este ejemplo demuestra un método para la detección simultánea de la cantidad total y/o estado de activación de una proteína de fusión oncogénica en combinación con una o ambas de las proteínas de longitud completa nativas que contienen secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica. En una realización en particular, el presente método permite la detección y/o la medición tanto de los niveles totales de BCR-ABL así como de los niveles totales de BCR y/o ABL de longitud completa nativas en una muestra biológica tal como una muestra de sangre o aspirado de médula ósea.

10 En ciertas realizaciones, los niveles de proteína nativa (por ejemplo, niveles de BCR y/o ABL de longitud completa) se determinan junto con los niveles de proteína de fusión oncogénica (por ejemplo, niveles de BCR-ABL) de una manera multiplexada en un lecho individual. En estas realizaciones, la proteína de longitud completa nativa se puede aislar de forma ventajosa junto con la proteína de fusión oncogénica de modo que los niveles de estas moléculas se determinan en el mismo lecho.

15 La Figura 25 ilustra que los niveles totales de BCR-ABL no cambiaban cuando un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la BCR de longitud completa nativa (cuyo dominio C-terminal no está presente en BCR-ABL) se aplicaba de forma puntual en la misma lámina en el mismo lecho como un anticuerpo dirigido contra la región N-terminal de BCR-ABL. La Figura 26 ilustra que la señal de BCR nativa libre detectada con un anticuerpo de BCR específico para el extremo N-terminal se reducía cuando un anticuerpo dirigido contra el extremo C-terminal de la BCR nativa se aplicaba de forma puntual en la misma lámina en el mismo lecho.

20 En realizaciones en particular, el método que se describe en el presente ejemplo se puede usar para detectar y/o medir los niveles totales de BCR-ABL así como los niveles totales de BCR o ABL de longitud completa nativa, y se puede calcular una proporción de los niveles totales de BCR-ABL con respecto a los niveles de BCR o ABL de longitud completa nativa. En algunos casos, la proporción de los niveles totales de BCR-ABL con respecto a los niveles de BCR o ABL de longitud completa nativa se calcula para proporcionar una determinación más precisa de indicadores de respuesta tales como, por ejemplo, una respuesta molecular importante, una respuesta molecular completa, una respuesta citogenética completa, y combinaciones de las mismas. En otros casos, el método el método que se describe en el presente ejemplo se puede usar para controlar cambios en la expresión de BCR-ABL con respecto a un control tal como BCR o ABL de longitud completa (por ejemplo, calculando una proporción de los niveles totales de BCR-ABL con respecto a los niveles de BCR o ABL de longitud completa nativa) como una función de la terapia (por ejemplo, terapia con inhibidor de tirosina quinasa).

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar el nivel o estado de activación de una proteína de fusión oncogénica, método que comprende:

- 5 (a) producir un extracto celular que comprende un extracto de células aisladas a partir de una muestra, en el que las células aisladas no se lavan antes de la lisis para producir el extracto celular;
- 10 (b) poner en contacto un extracto celular con un primer resto de unión específico para un primer dominio de una primera proteína de longitud completa en condiciones adecuadas para transformar la primera proteína de longitud completa presente en el extracto celular en un complejo que comprende la primera proteína de longitud completa y el primer resto de unión, en el que el primer dominio de la primera proteína de longitud completa está ausente de una proteína de fusión oncogénica correspondiente que comprende un segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa fusionado a un primer dominio de una segunda proteína de longitud completa diferente;
- 15 (c) retirar el complejo de la etapa (b) del extracto celular para formar un extracto celular desprovisto de la primera proteína de longitud completa;
- (d) poner en contacto el extracto celular de la etapa (c) con un segundo resto de unión, un tercer resto de unión y un cuarto resto de unión en condiciones adecuadas para transformar la proteína de fusión oncogénica presente en el extracto celular en un complejo que comprende la proteína de fusión oncogénica y el segundo, tercer y
- 20 cuarto restos de unión; en el que el segundo resto de unión es específico para el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa, en el que el segundo resto de unión está sujeto en un soporte sólido en una matriz direccionable, en el que el tercer resto de unión está etiquetado con una glucosa oxidasa y es específico para uno de los
- 25 siguientes: (i) el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente; (ii) el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa; o (iii) el sitio de fusión entre el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa y el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente, en el que el cuarto resto de unión está etiquetado con un primer miembro de un par de amplificación de señales y es específico para el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente, y
- 30 en el que la glucosa oxidasa genera un agente oxidante que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señales;
- (e) incubar el complejo de la etapa (d) con un segundo miembro del par de amplificación de señales para generar una señal amplificada; y
- 35 (f) detectar la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales, determinando de ese modo el nivel o estado de activación de la proteína de fusión oncogénica.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre completa, suero, plasma, orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspiración a través del pezón, linfa, saliva, aspiración con aguja fina (FNA), y combinaciones de los mismos.

3. El método de la reivindicación 2, en el que la muestra se obtiene a partir de un paciente con cáncer.

4. El método de la reivindicación 3, en el que el cáncer está causado por la formación de una proteína de fusión oncogénica debido a una translocación cromosómica en las células cancerosas y en el que el cáncer es opcionalmente una neoplasia hematológica, sarcoma osteogénico, o sarcoma de tejido blando, y en el que la neoplasia hematológica es opcionalmente una leucemia tal como una leucemia mielógena crónica (CML) o linfoma.

5. El método de la reivindicación 2, en el que: (i) las células aisladas se seleccionan entre el grupo que consiste en células tumorales en circulación, leucocitos, y combinaciones de los mismos; o (ii) las células aisladas se estimulan *in vitro* con factores de crecimiento.

6. El método de la reivindicación 5(ii), en el que: (i) las células aisladas se incuban con un fármaco anticáncer antes de la estimulación con factor de crecimiento; o (ii) las células aisladas se lisan después de la estimulación con factor de crecimiento para producir el extracto celular.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína de fusión oncogénica se selecciona de entre el grupo que consiste en BCR-ABL, DEK-CAN, E2A-PBX1, RARa-PML, 1REL-URG, CBF/3-MYH11, AML1-MTG8, EWS-FLI, LYT-10-Cc, HRX-ENL, HRX-AF4, NPM-ALK, IGH-MYC, RUNX1-ETO, TEL-TRKC, TEL-AML1, MLL-AF4, TCR-RBTN2, COL1A1-PDGF, E2A-HLF, PAX3-FKHR, ETV6-NTRK3, RET-PTC, TMRSS-ERG, TPR-MET, y combinaciones de los mismos.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL, y opcionalmente:

en el que la primera proteína de longitud completa es BCR, o en el que el primer dominio de la primera proteína

- de longitud completa comprende la región carboxilo-terminal de BCR (BCR-C), en el que el segundo dominio, diferente de la primera proteína de longitud completa comprende la región amino-terminal de BCR (BCR-N), o en el que la segunda proteína de longitud completa diferente es ABL, o en el que el primer dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente comprende la región carboxilo-terminal de ABL (ABL-C), o en el que la primera proteína de longitud completa es ABL, o en el que la segunda proteína de longitud completa diferente es BCR.
- 5
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el estado de activación se selecciona de entre el grupo que consiste en un estado de fosforilación, estado de ubiquitinación, estado de formación de complejos, y combinaciones de los mismos, o que comprende adicionalmente determinar el nivel o estado de activación de una o más moléculas de transducción de señales, siendo dicha una o más moléculas de transducción de señales opcionalmente un sustrato de BCR-ABL, siendo dicho sustrato de BCR-ABL seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en CRKL, JAK2, STAT5, VAV, BAP-1, y combinaciones de los mismos.
- 10
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que: (i) el primer resto de unión comprende un primer anticuerpo, estando dicho primer anticuerpo unido opcionalmente a un soporte sólido, siendo dicho soporte sólido seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en vidrio, plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibra, y combinaciones de los mismos; o (ii) el segundo resto de unión comprende un segundo anticuerpo, estando dicho segundo anticuerpo opcionalmente unido a un soporte sólido.
- 15
11. El método de la reivindicación 1, en el que el extracto celular de la etapa (c) se pone en contacto con una serie de dilución del segundo resto de unión para formar una pluralidad de complejos que comprenden la proteína de fusión oncogénica y el segundo resto de unión.
- 20
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el tercer y cuarto restos de unión comprenden un tercer y cuarto anticuerpos, respectivamente.
- 25
13. El método de la reivindicación 12, en el que:
- 30
- (i) el tercer y cuarto anticuerpos son ambos anticuerpos independientes del estado de activación, y opcionalmente en el que la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales es correlativa a la cantidad total de la proteína de fusión oncogénica; o
- (ii) el tercer anticuerpo es un anticuerpo independiente del estado de activación y el cuarto anticuerpo es un anticuerpo dependiente del estado de activación, en el que la señal amplificada generada a partir del primer y segundo miembros del par de amplificación de señales es opcionalmente correlativa a la cantidad de proteína de fusión oncogénica activada.
- 35
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el tercer resto de unión está etiquetado directamente con la glucosa oxidasa, o en el que el cuarto resto de unión está etiquetado directamente con el primer miembro del par de amplificación de señales, o en el que el cuarto resto de unión está etiquetado con el primer miembro del par de amplificación de señales a través de la unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con el segundo anticuerpo de detección y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de señales.
- 40
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende adicionalmente:
- 45
- (g) poner en contacto el extracto celular con un quinto resto de unión específico para un segundo dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente en condiciones adecuadas para transformar la segunda proteína de longitud completa diferente presente en el extracto celular en un complejo que comprende la segunda proteína de longitud completa diferente y el quinto resto de unión, en el que el segundo dominio de la segunda proteína de longitud completa diferente está ausente de la proteína de fusión oncogénica; y
- 50
- (h) retirar el complejo de la etapa (g) del extracto celular para formar un extracto celular desprovisto de la segunda proteína de longitud completa diferente,
- 55
- en el que la etapa (g) se realiza antes, durante o después de la etapa (b), y en el que el quinto resto de unión comprende opcionalmente un quinto anticuerpo, en el que el quinto anticuerpo está unido opcionalmente a un soporte sólido, siendo dicho soporte sólido seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en vidrio, plástico, chips, pasadores, filtros, perlas, papel, membrana, haces de fibra, y combinaciones de los mismos.
- 60
16. Un método para optimizar la terapia y/o reducir la toxicidad en un sujeto con cáncer y que recibe un ciclo de terapia para el tratamiento de cáncer, método que comprende:
- 65
- (a) lisar las células cancerosas aisladas de un sujeto después de la administración de un fármaco anticáncer para producir un extracto celular, en el que las células cancerosas aisladas no se lavan antes de la lisis;
- (b) medir un nivel de expresión y/o activación de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular de

acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y

(c) comparar el nivel de expresión medido y/o activación de la proteína de fusión oncogénica con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y

5 (d) determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (c).

10 17. El método de la reivindicación 16, en el que la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL, o en el que se determina que el sujeto tiene células cancerosas que expresan la proteína de fusión oncogénica antes de recibir el ciclo de terapia, siendo dicho sujeto opcionalmente positivo para BCR- ABL.

15 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 o 17, en el que tanto el nivel de expresión como el nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica se miden en el extracto celular, dicha etapa (b) además comprende opcionalmente calcular una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total, dicha etapa (c) comprende opcionalmente comparar la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total con respecto a una proporción de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total calculada para el sujeto en un momento anterior.

20 19. El método de la reivindicación 18, en el que:

(i) la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total se correlaciona con el porcentaje de inhibición de la proteína de fusión oncogénica activada después del tratamiento con el fármaco anticáncer;

25 (ii) la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total es relativa con respecto al nivel de una proteína de control; o

(iii) en el que la proporción calculada de los niveles de proteína de fusión oncogénica activada con respecto al total comprende una proporción de los niveles de proteína BCR-ABL fosfo/total

30 y en el que la proteína de control comprende opcionalmente una proteína de longitud completa nativa que contiene secuencias o dominios encontrados dentro de la proteína de fusión oncogénica, o en el que la proteína de control se selecciona entre el grupo que consiste en BCR de longitud completa, ABL de longitud completa, y combinaciones de los mismos.

35 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que menos de aproximadamente un 50 % de inhibición del nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica indica una necesidad de aumentar la dosis posterior del ciclo de terapia o administrar un ciclo de terapia diferente, o en el que menos de aproximadamente un 50 % de inhibición del nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica indica una falta de cumplimiento del ciclo de terapia por parte del paciente, la existencia de posibles efectos secundarios o toxicidad asociados con el ciclo de terapia, o combinaciones de los mismos, o en el que más de aproximadamente un 80 % de inhibición del nivel de activación de la proteína de fusión oncogénica indica que el sujeto está con el ciclo de terapia correcto con la dosis correcta.

45 21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, en el que el cáncer es leucemia mielógena crónica (CML), o en el que el fármaco anticáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, inhibidor de tirosina quinasa, agente quimioterapéutico, agente terapéutico hormonal, agente radioterapéutico, vacuna, y combinaciones de los mismos, dicho inhibidor de tirosina quinasa se selecciona de entre el grupo que consiste en mesilato de imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib (SKI-606), y combinaciones de los mismos.

50 22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que las etapas (c) a (e) como alternativa comprenden:

(c') medir un nivel de expresión y/o activación de una proteína de fusión oncogénica y una o más moléculas de transducción de señales en su ruta en el extracto celular; y

55 (d') comparar el nivel medido de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales con un nivel de expresión y/o activación de la proteína de fusión oncogénica y moléculas de transducción de señales medido en un momento anterior durante el ciclo de terapia; y

(e') determinar una dosis posterior del ciclo de terapia para el sujeto o si se debería administrar al sujeto un ciclo de terapia diferente basándose en la comparación de la etapa (d').

60 23. Un método para seleccionar un fármaco anticáncer adecuado para el tratamiento de un cáncer, o para identificar la respuesta de un cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer, o para predecir la respuesta de un sujeto que tiene cáncer al tratamiento con un fármaco anticáncer, o para determinar si un sujeto que tiene cáncer es resistente al tratamiento con un fármaco anticáncer, método que comprende:

65 (a) lisar las células cancerosas aisladas de un sujeto después de la administración de un fármaco anticáncer, o

antes de la incubación con un fármaco anticáncer, para producir un extracto celular, en el que las células cancerosas aisladas no se lavan antes de la lisis;

(b) medir un nivel de expresión y/o activación de una proteína de fusión oncogénica en el extracto celular de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y

- 5 (c) determinar si el fármaco anticáncer es adecuado o inadecuado para el tratamiento del cáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectados para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer, identificar el cáncer como que responde o no responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer,
- 10

predecir la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer,

- 15 determinar si el sujeto es resistente o responde al tratamiento con el fármaco anticáncer mediante la comparación del nivel de expresión y/o activación detectado para la proteína de fusión oncogénica con un nivel de referencia y/o perfil de activación generado en ausencia del fármaco anticáncer o en presencia del fármaco anticáncer en un momento anterior, respectivamente.

- 20 24. El método de la reivindicación 23, en el que el cáncer es leucemia mielógena crónica (CML), o en el que el fármaco anticáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo monoclonal, inhibidor de tirosina quinasa, agente quimioterapéutico, agente terapéutico hormonal, agente radioterapéutico, vacuna, y combinaciones de los mismos, siendo dicho anticuerpo monoclonal seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en trastuzumab, alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, gemtuzumab, panitumumab, rituximab, tositumomab, y combinaciones de los mismos, siendo dicho inhibidor de tirosina quinasa seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en mesilato de imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib (SKI-606), gefitinib, sunitinib, erlotinib, lapatinib, canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), leflunomida (SU101), vandetanib (ZD6474), y combinaciones de los mismos, siendo dicho agente quimioterapéutico seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en pemetrexed, gemcitabina, sirolimus (rapamicina), análogos de rapamicina, compuestos de platino, carboplatino, cisplatino, satraplatino, paclitaxel, docetaxel (Taxotere®), temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), y combinaciones de los mismos, siendo dicho agente terapéutico hormonal seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en inhibidores de aromataasa, moduladores selectivos de receptor de estrógenos, esteroides, finasterida, agonistas de hormona liberadora de gonadotropina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos, siendo dicho agente radioterapéutico seleccionado opcionalmente de entre el grupo que consiste en ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹A, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹²Bi, y combinaciones de los mismos.
- 25
- 30
- 35

25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la proteína de fusión oncogénica es BCR-ABL y en el que el primer resto de unión es un anticuerpo anti-BCR específico para un dominio C-terminal de proteína BCR de longitud completa, en el que el segundo resto de unión es opcionalmente un anticuerpo anti-BCR específico para un dominio N-terminal de proteína BCR de longitud completa, en el que el tercer resto de unión es opcionalmente un anticuerpo anti-ABL específico para un dominio C-terminal de proteína ABL de longitud completa, y en el que el cuarto resto de unión es opcionalmente un anticuerpo que se une a fosfo-ABL-C.
- 40
- 45

26. El método de la reivindicación 1, en el que el soporte sólido se selecciona de entre el grupo que consiste en vidrio, plástico, chips, filtros, papel, membrana, y combinaciones de los mismos.

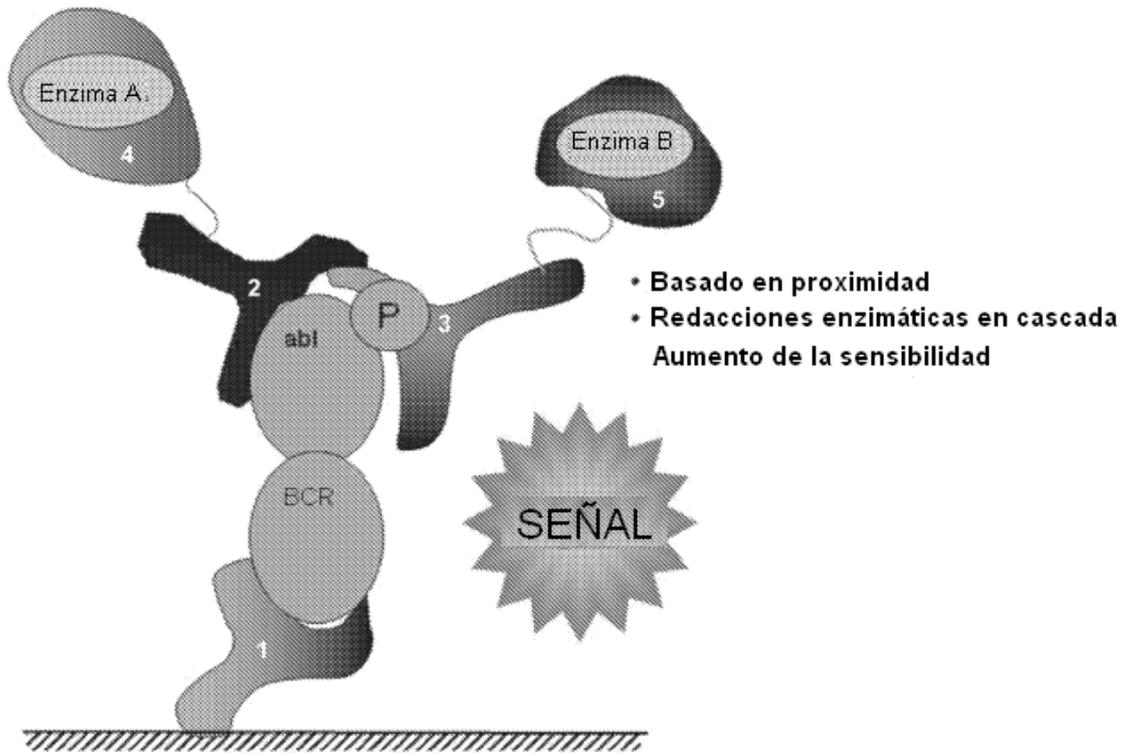


FIG. 1

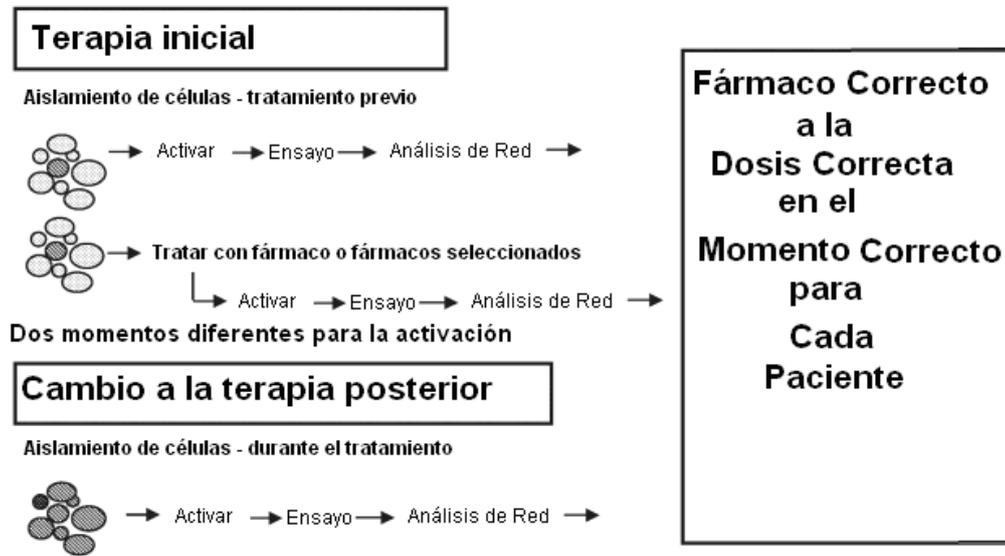


FIG. 2

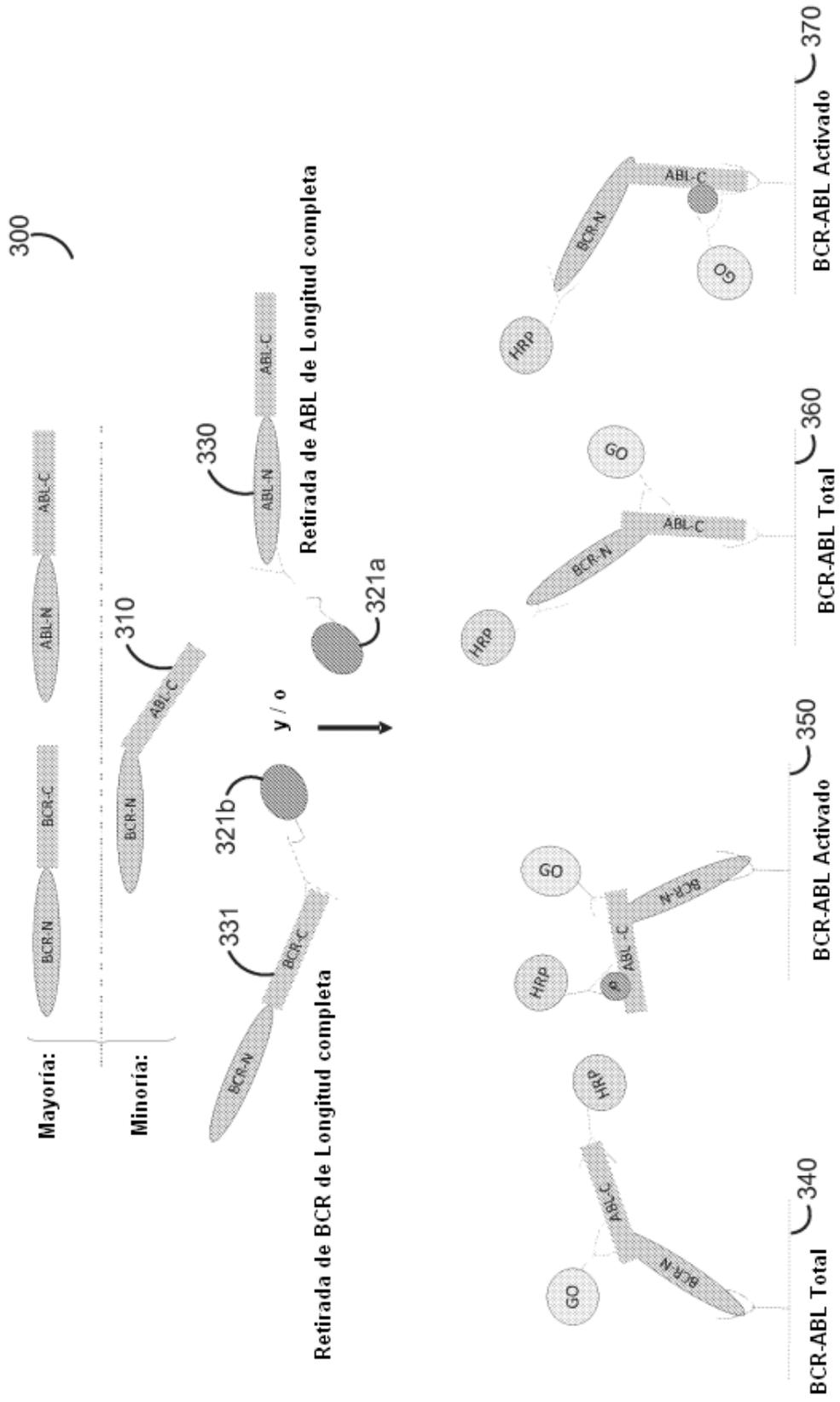


FIG. 3A

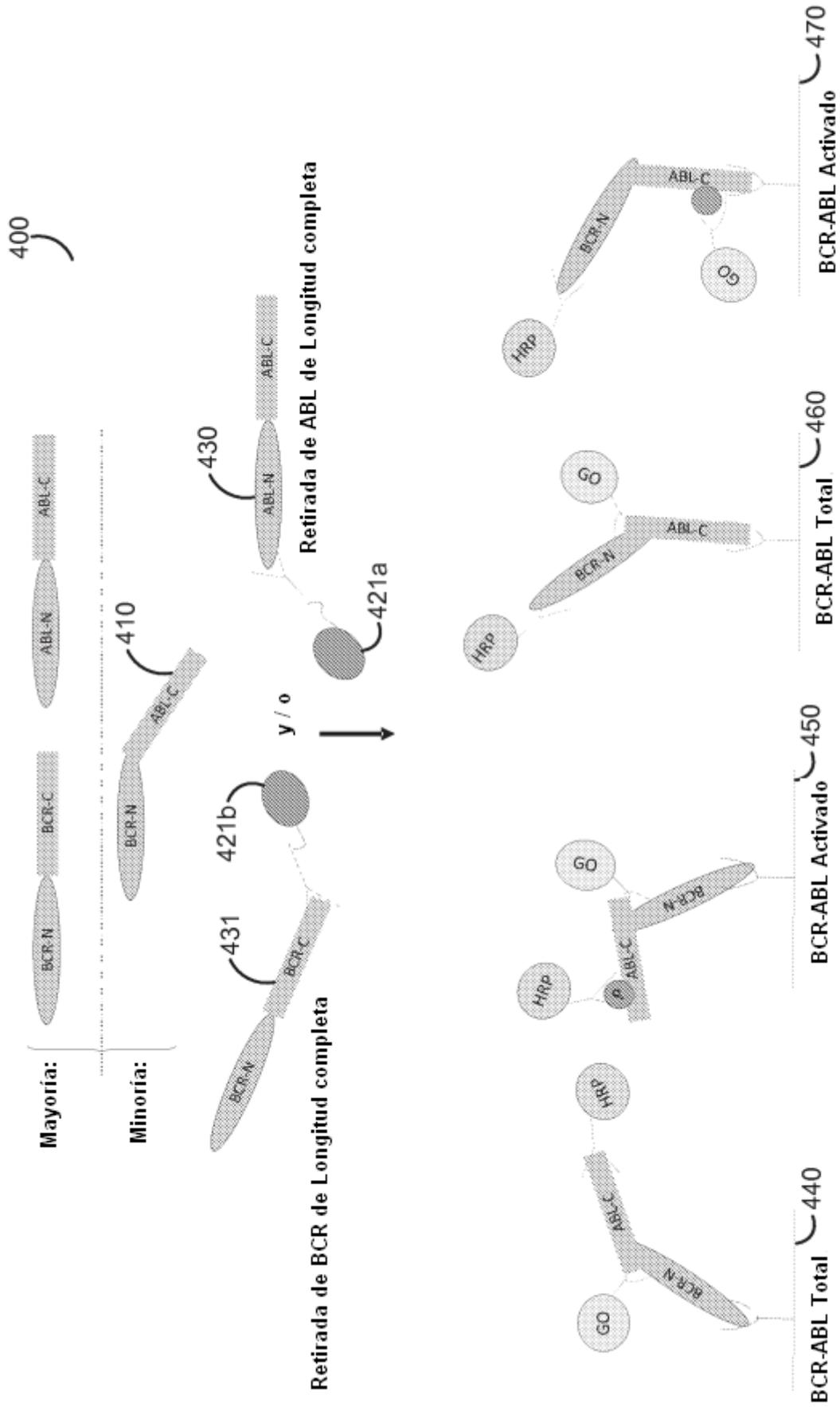


FIG. 3B

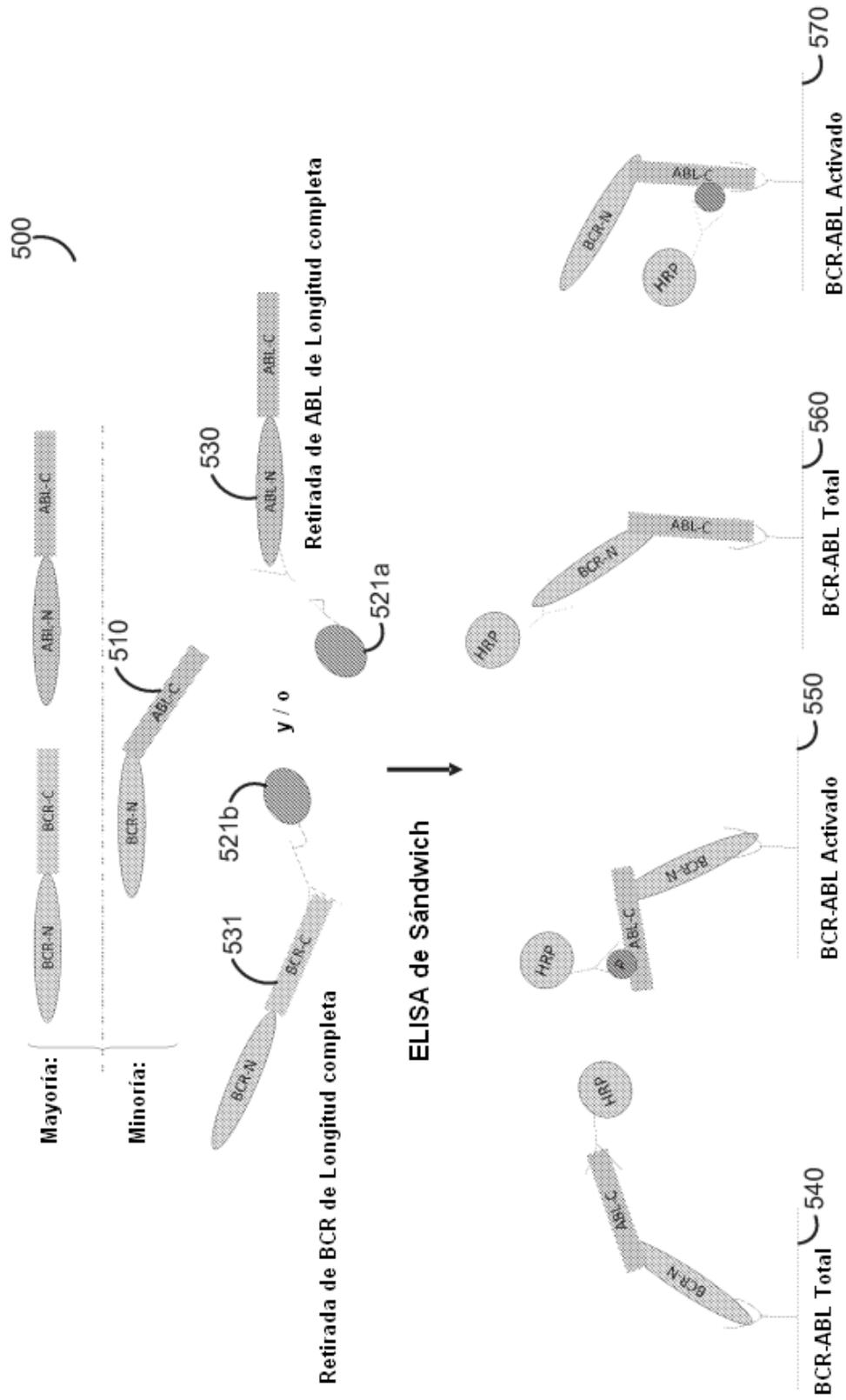


FIG. 3C

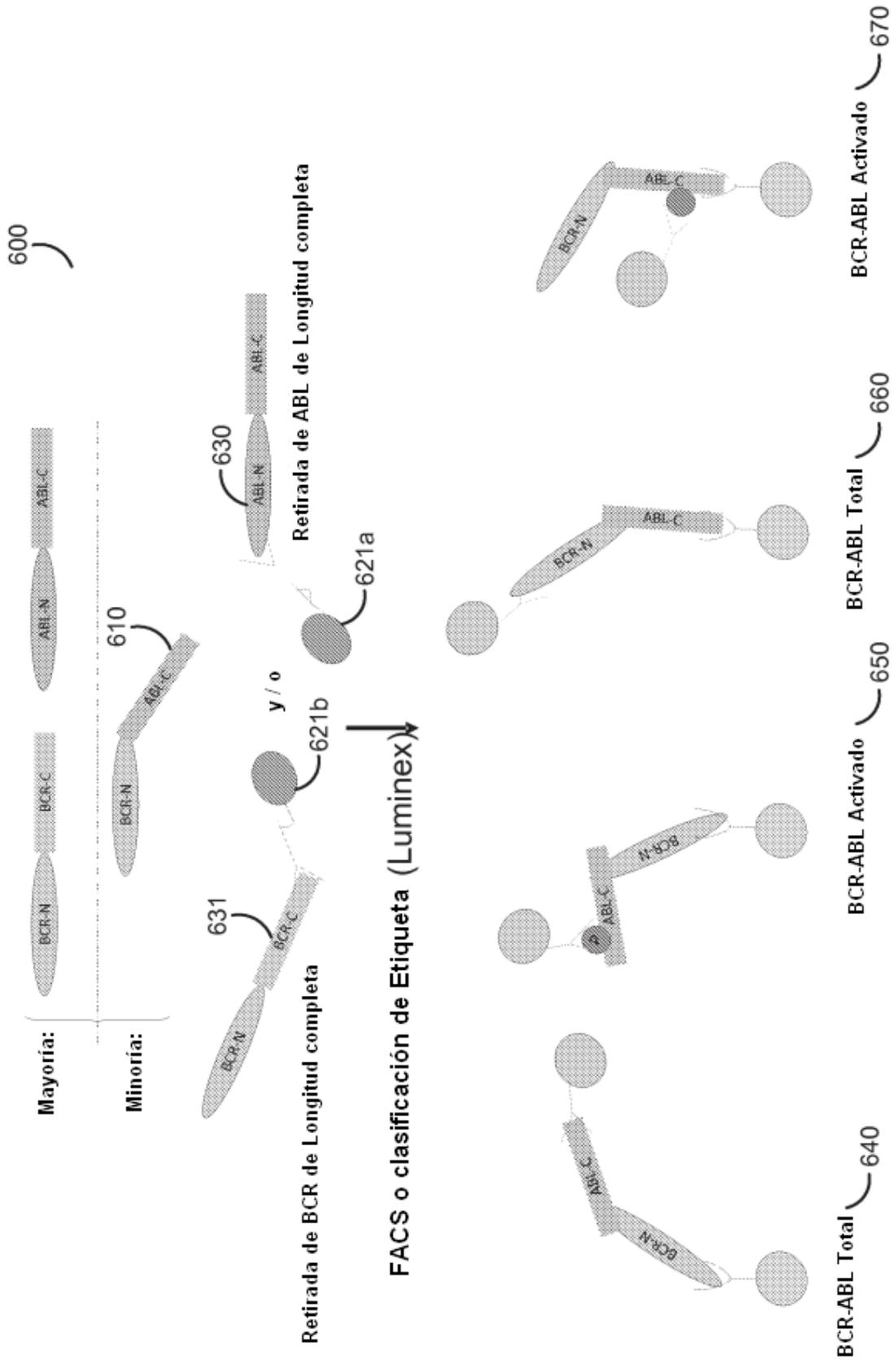
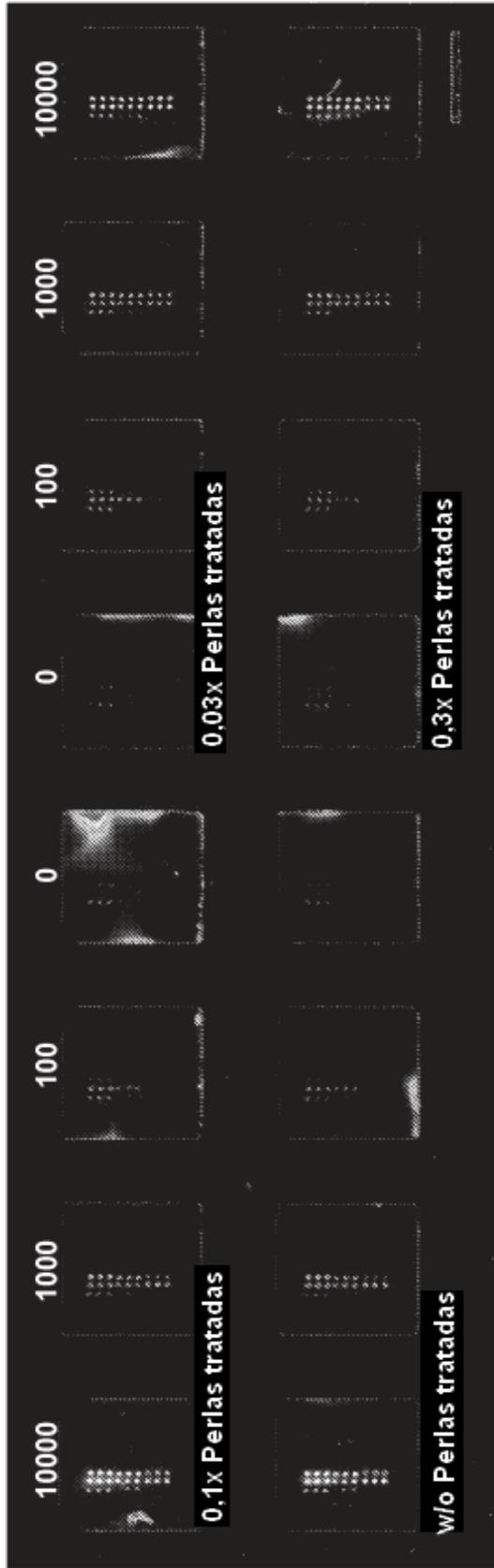
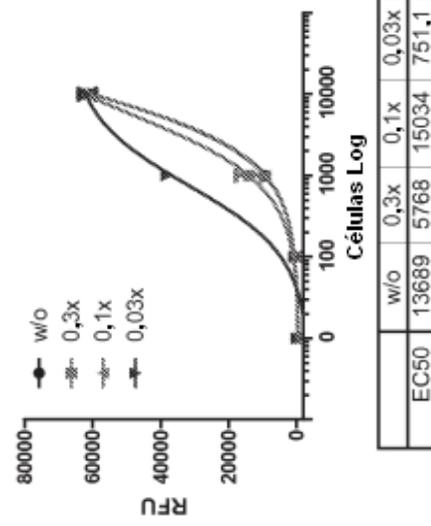


FIG. 3D

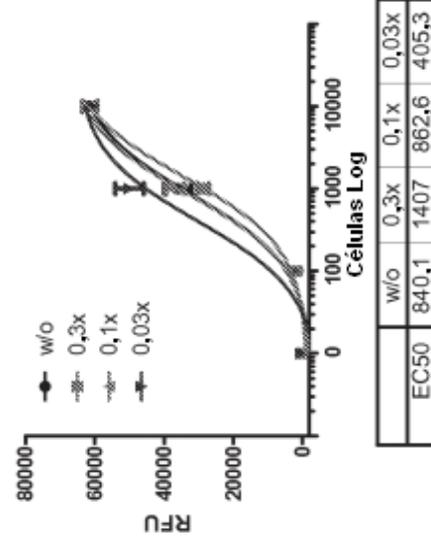


Captura: IgG, BCR Ab, ABL Ab; Detección: ABL Ab-HRP

BCR-ABL Después de Retirada de BCR Libre en Células K562 (0,25 mg/ml de captura)



BCR-ABL Después de Retirada de BCR Libre en Células K562 (0,5 mg/ml de captura)



BCR-ABL Después de Retirada de BCR Libre en Células K562 (1 mg/ml de captura)

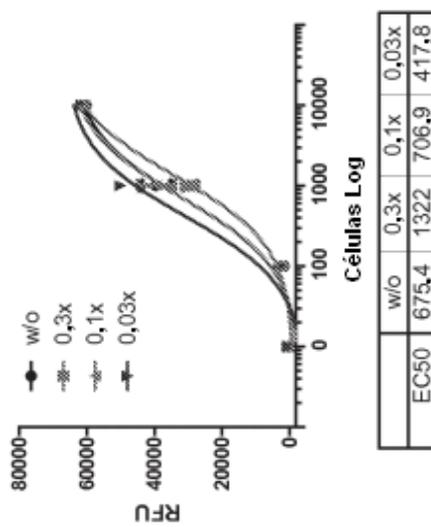
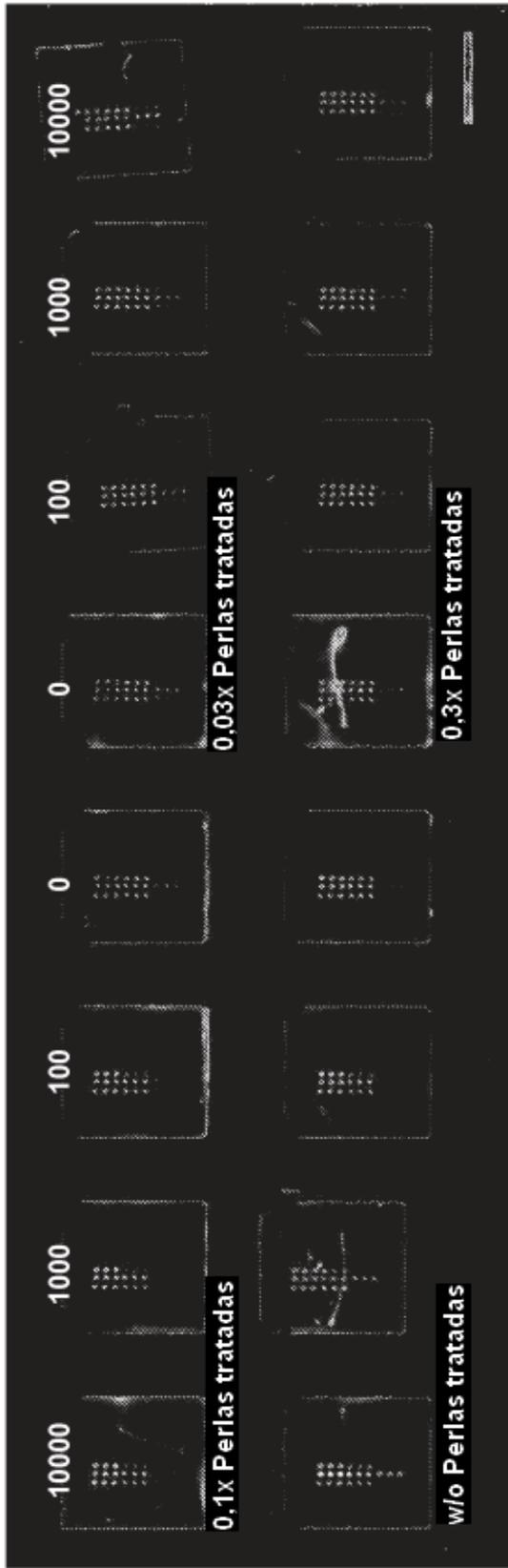


FIG. 4



Captura: IgG, BCR Ab, ABL Ab; Detección: Ab-HRP de BCR C-terminal

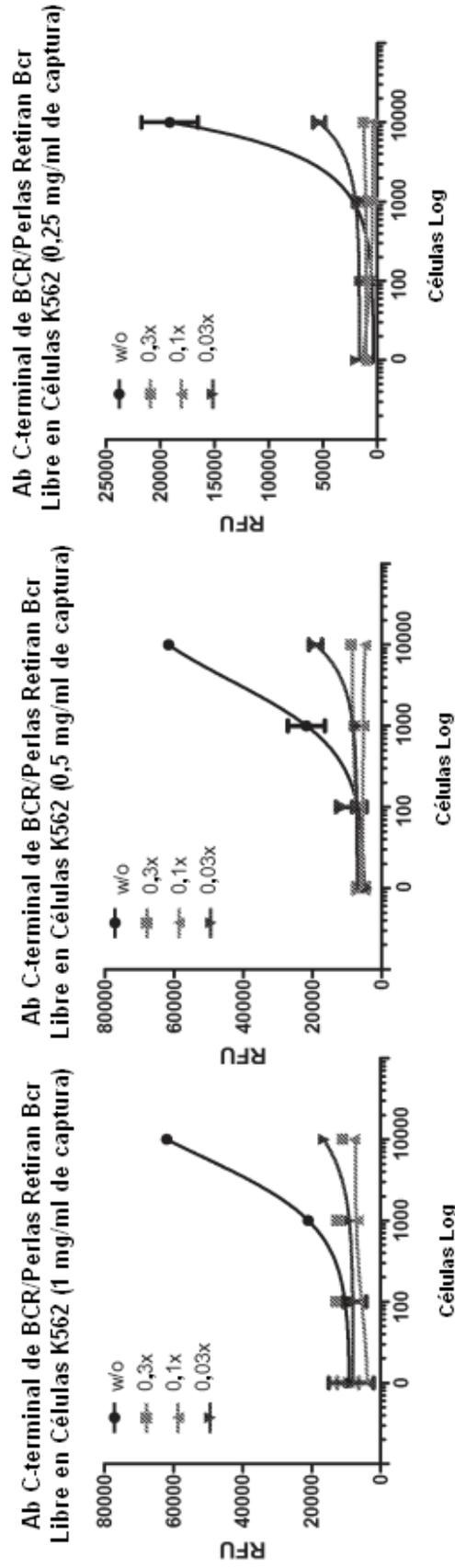


FIG. 5

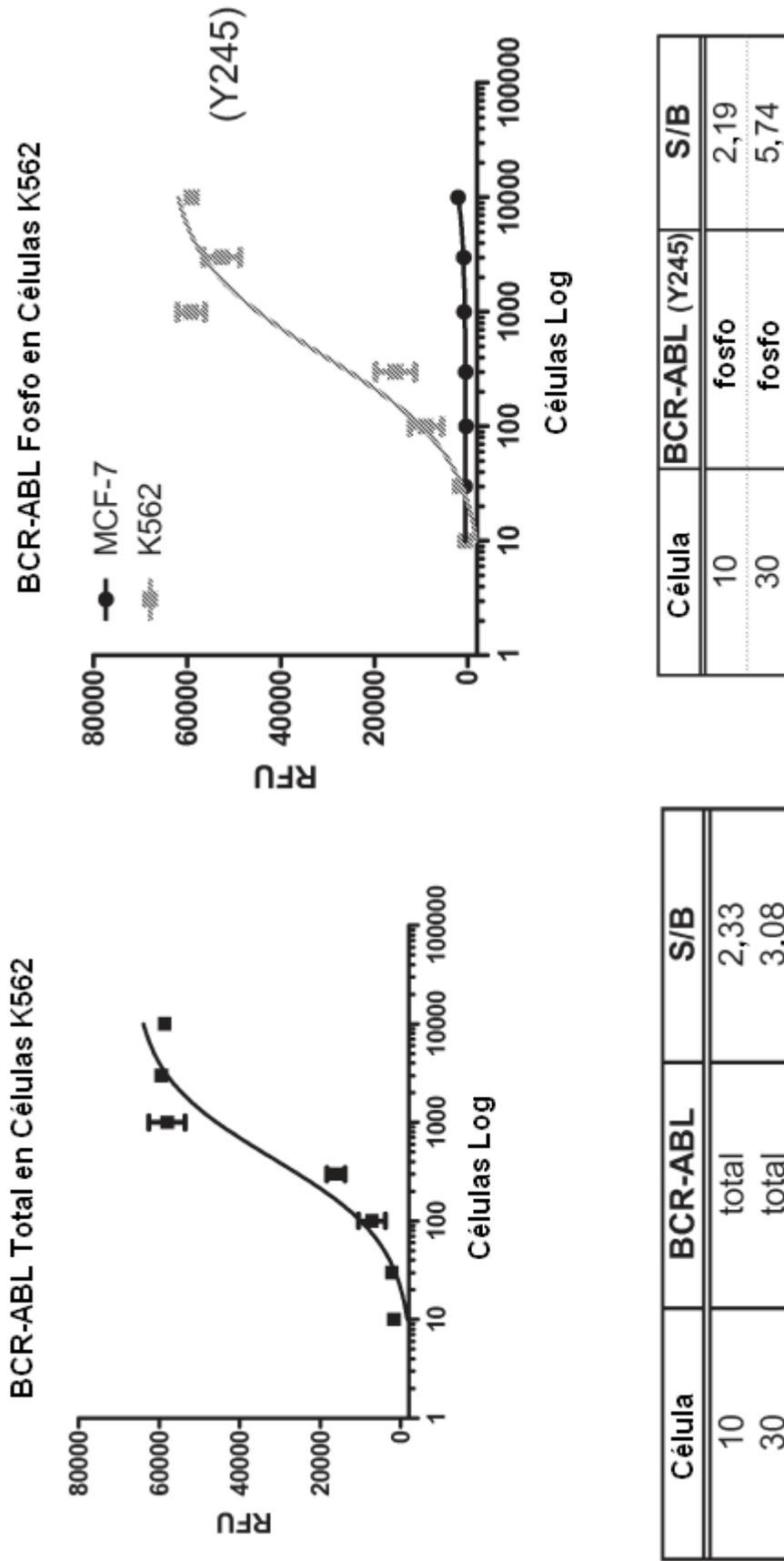


FIG. 6

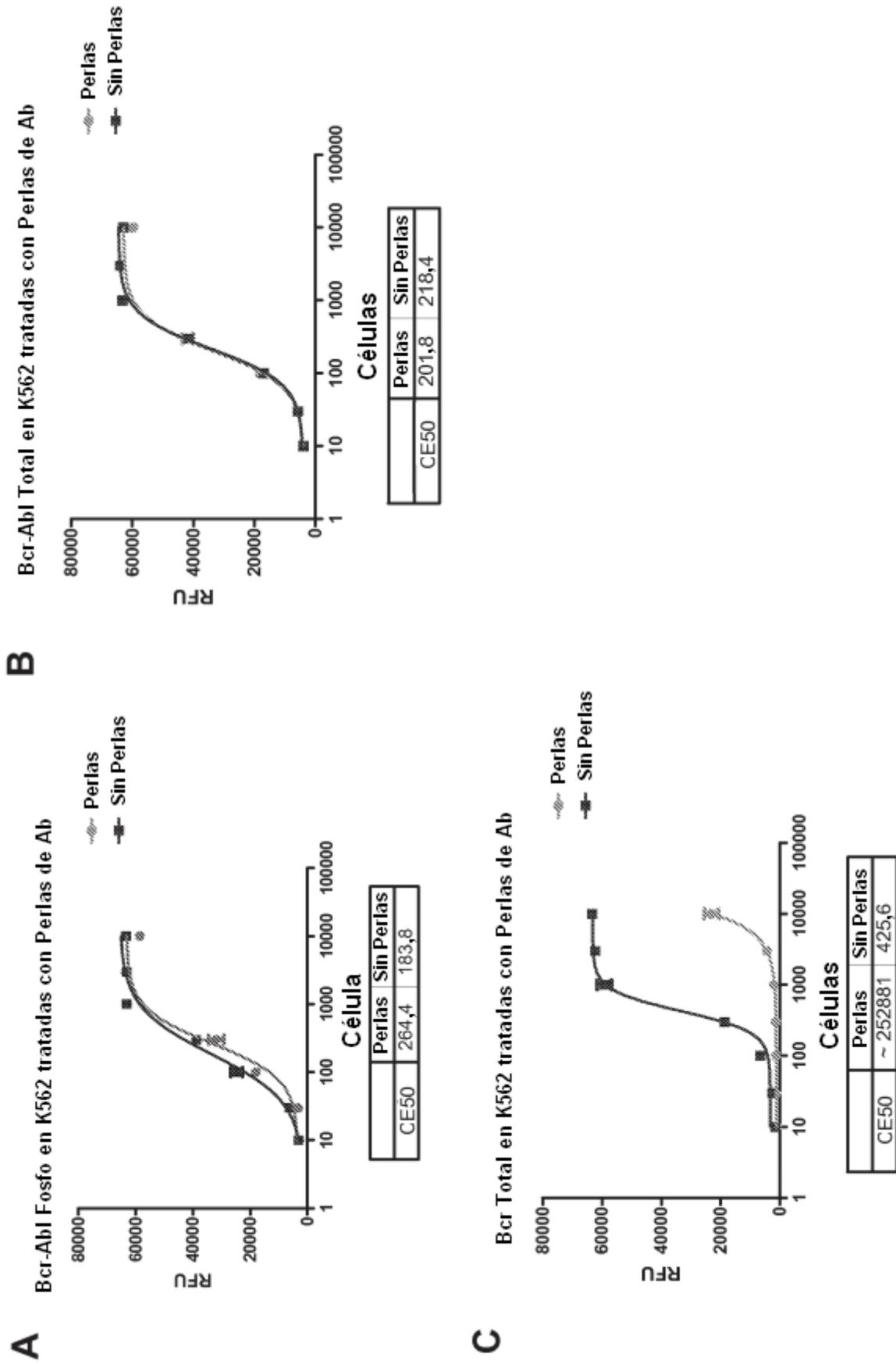
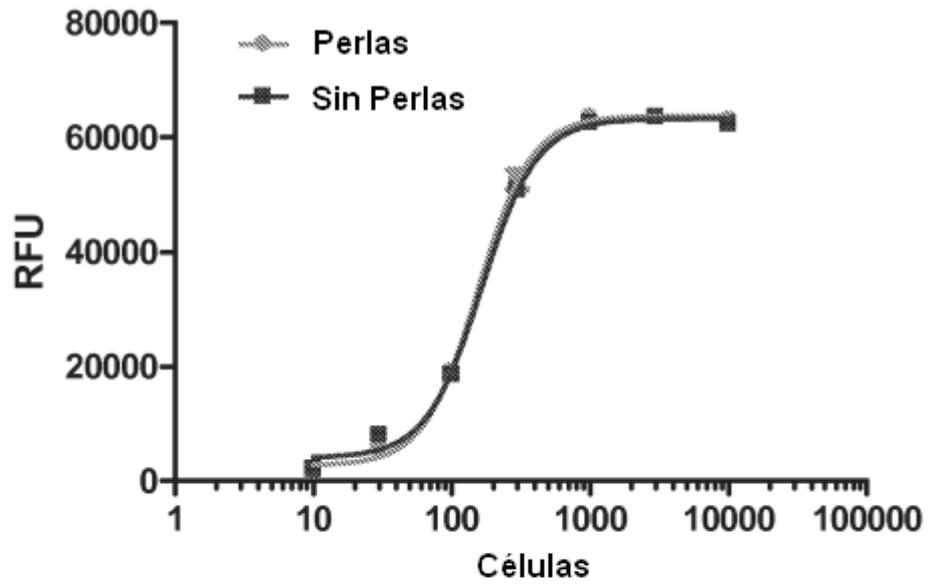


FIG. 7



	Perlas	Sin Perlas
CE50	154,7	164,6

FIG. 8B

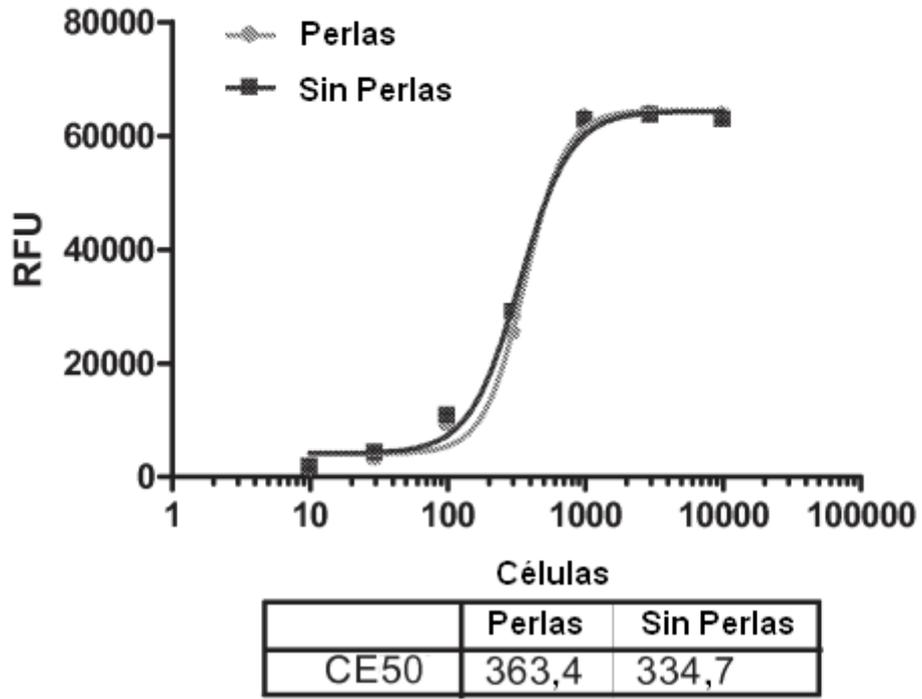


FIG. 9B

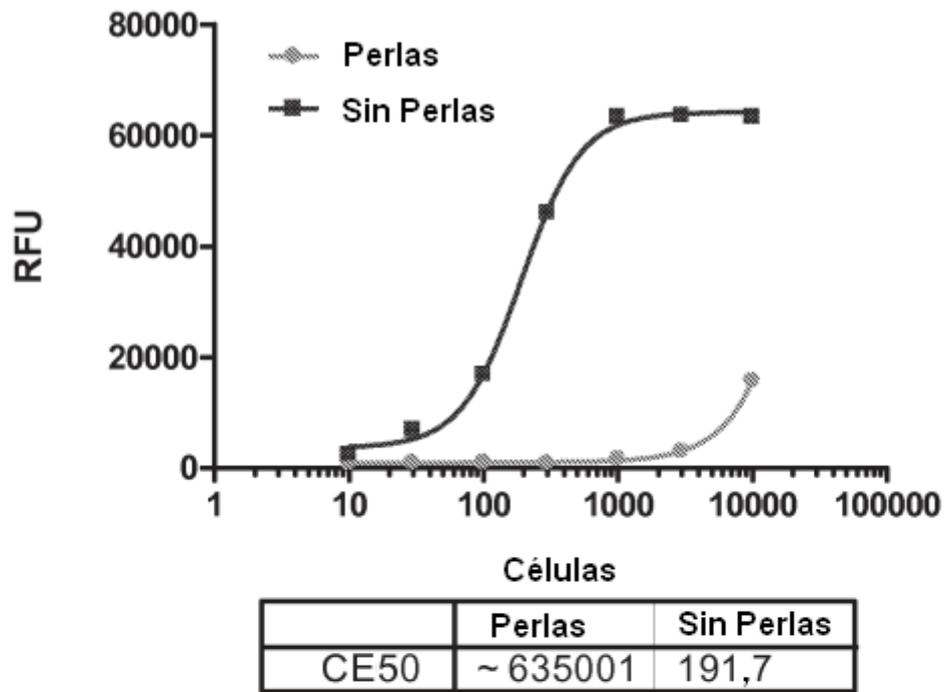


FIG. 10B

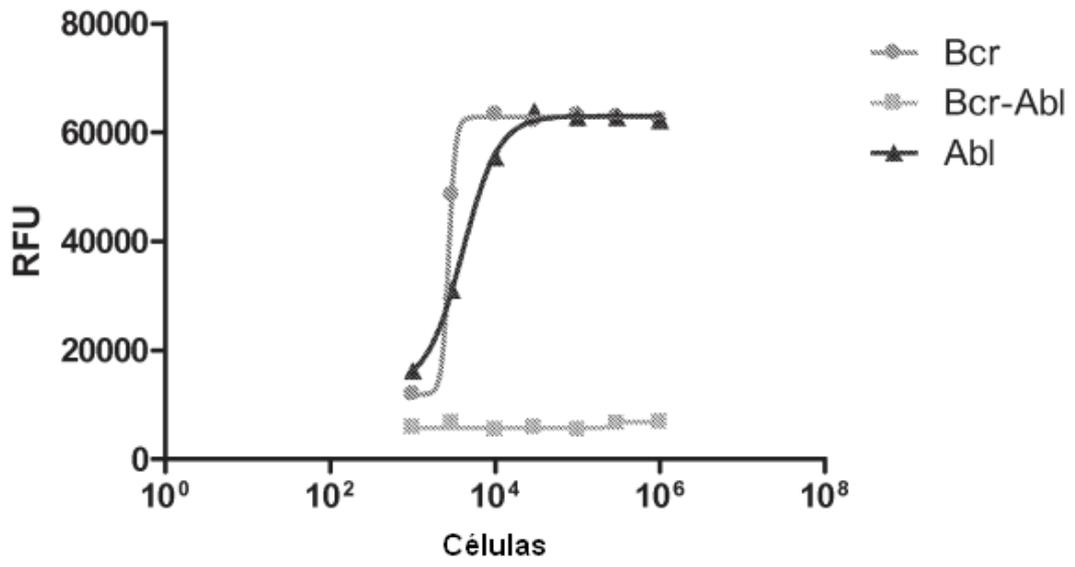


FIG. 11

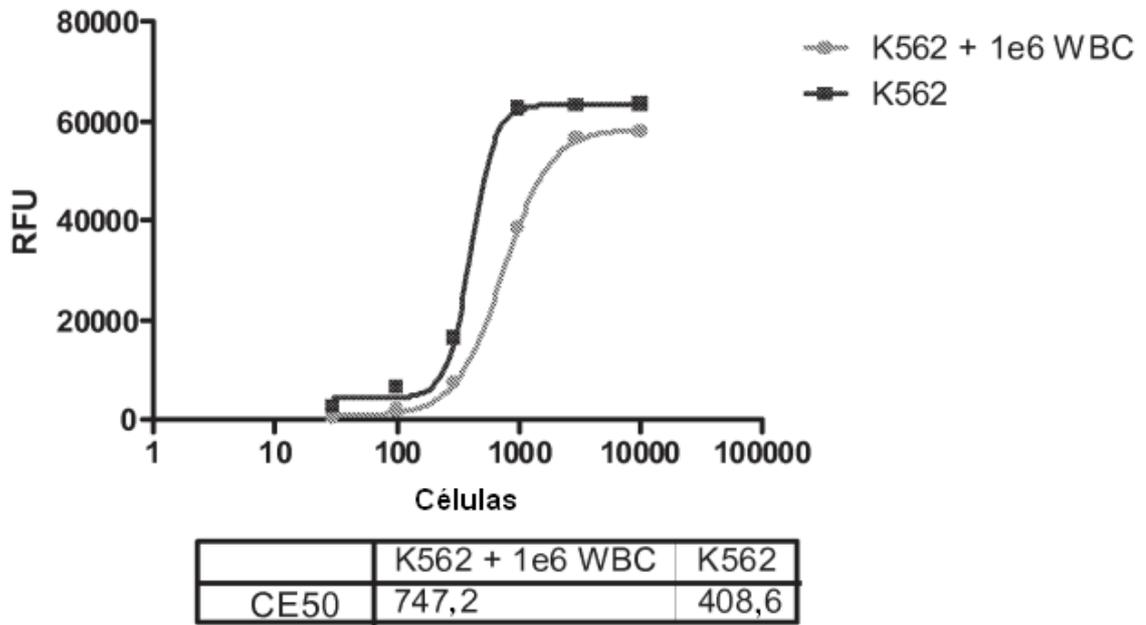
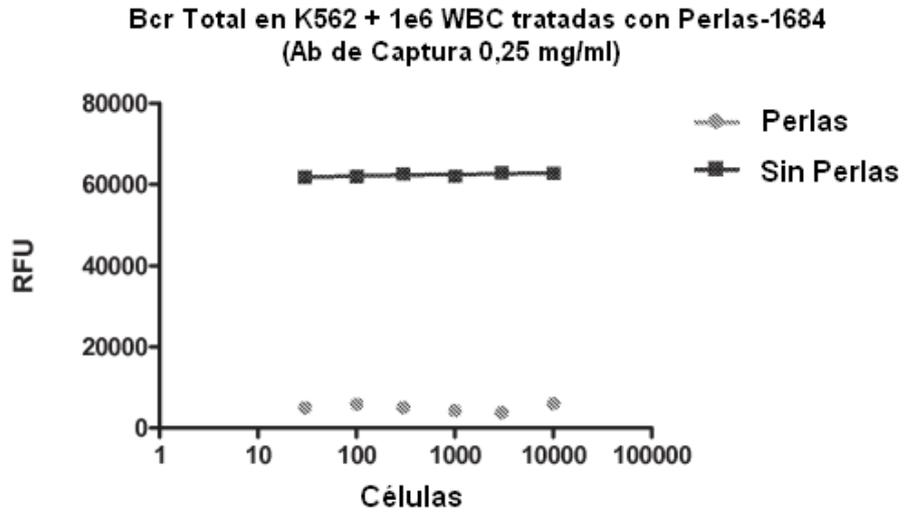


FIG. 12

A



B

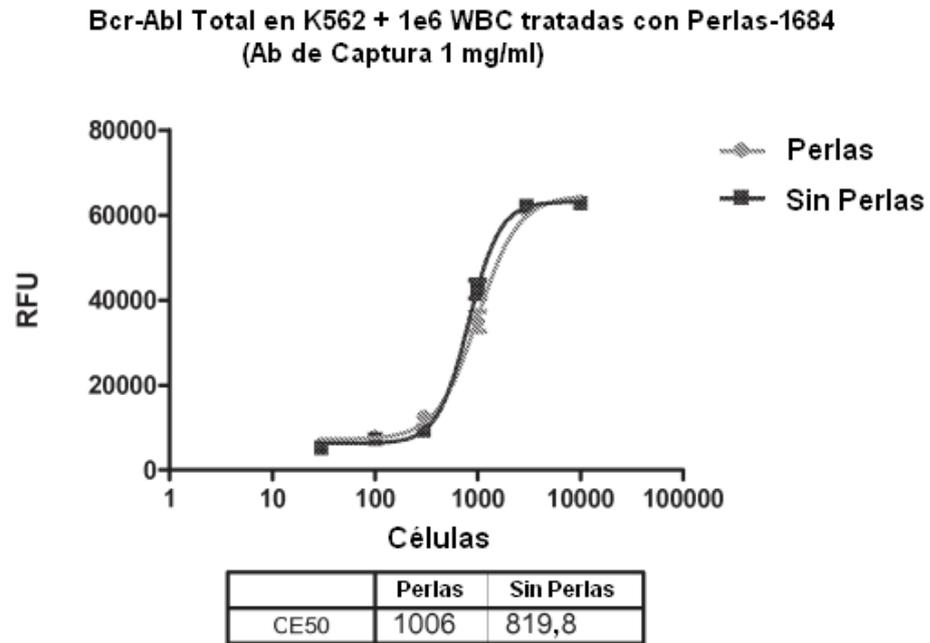


FIG. 13

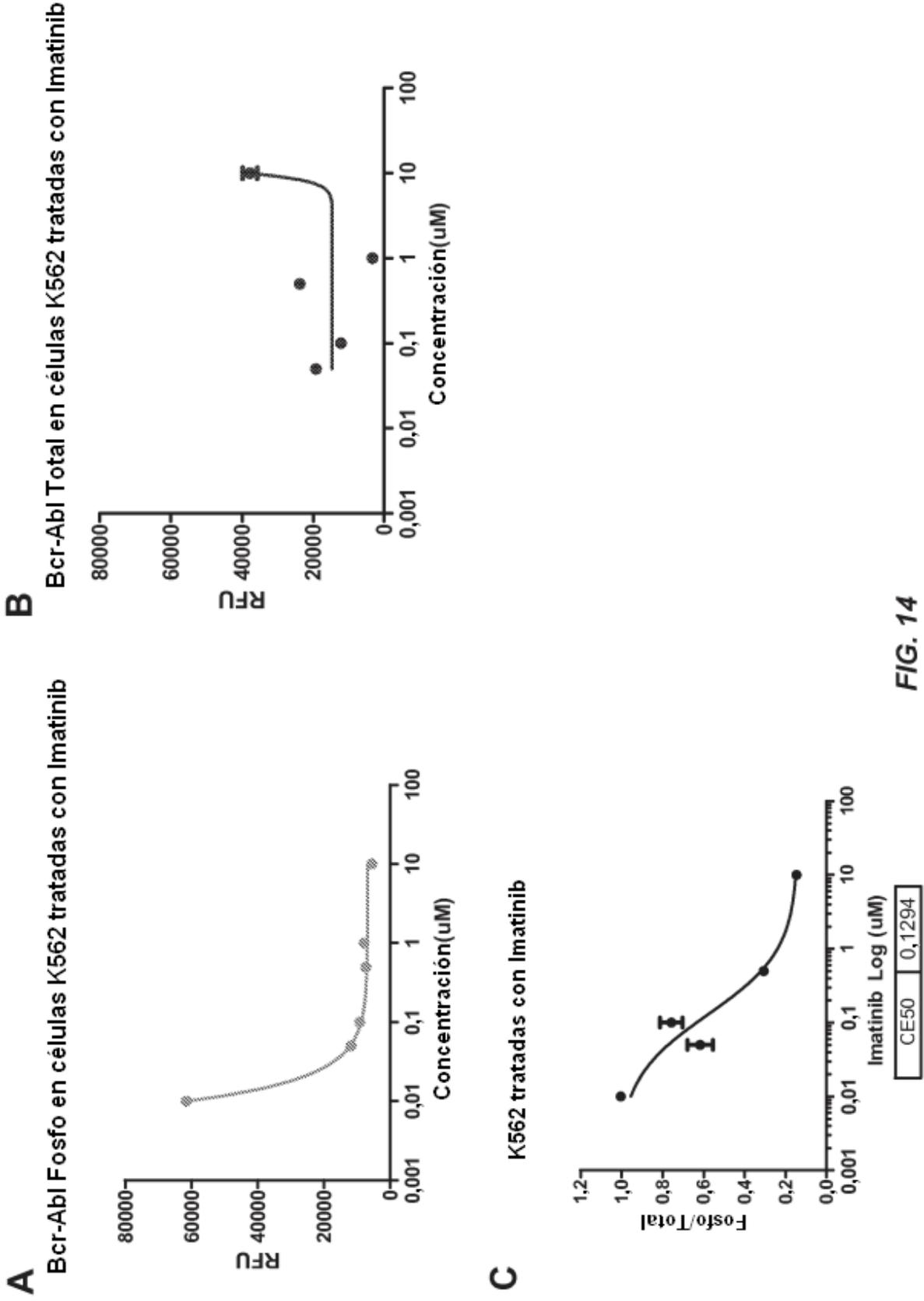


FIG. 14

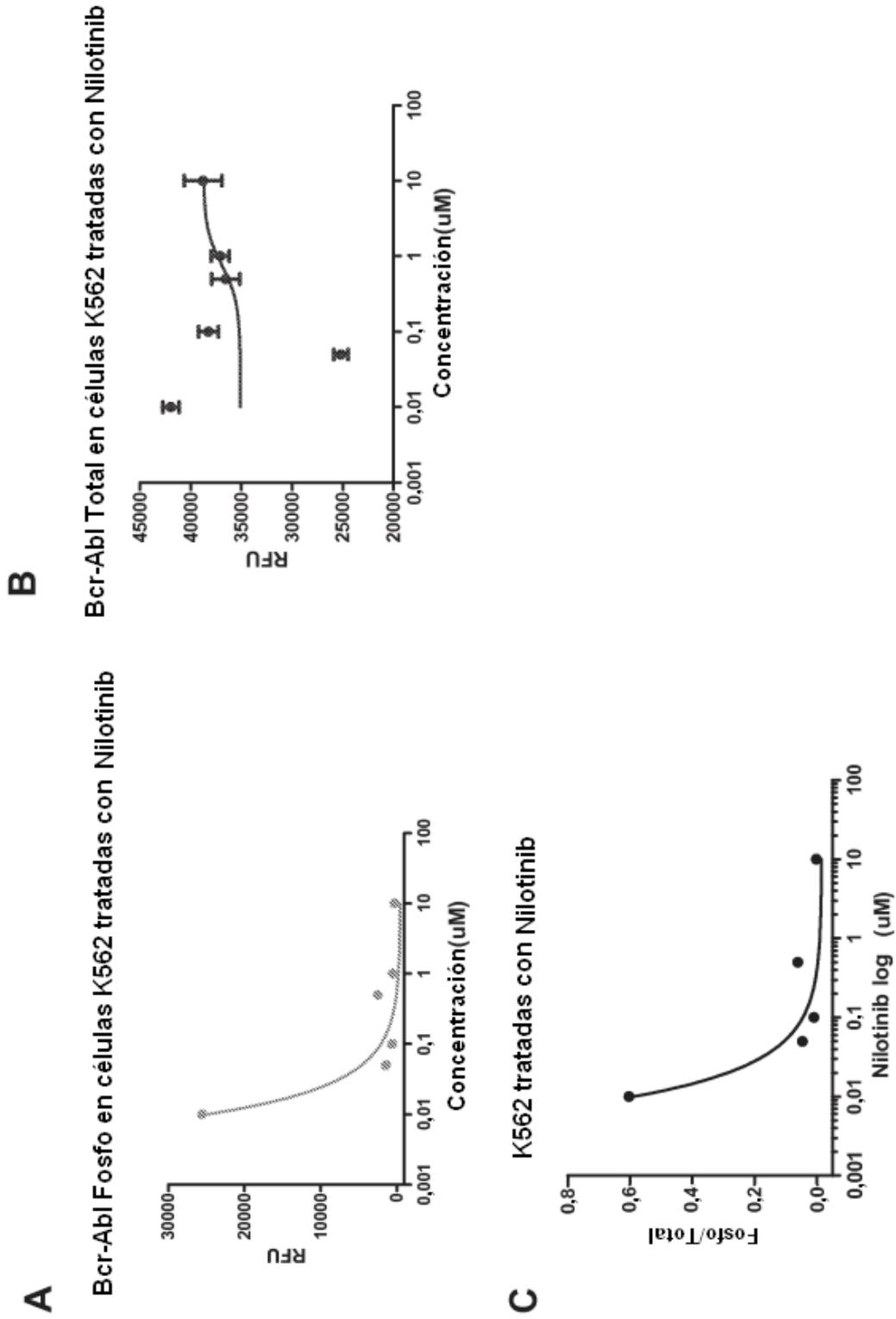


FIG. 15

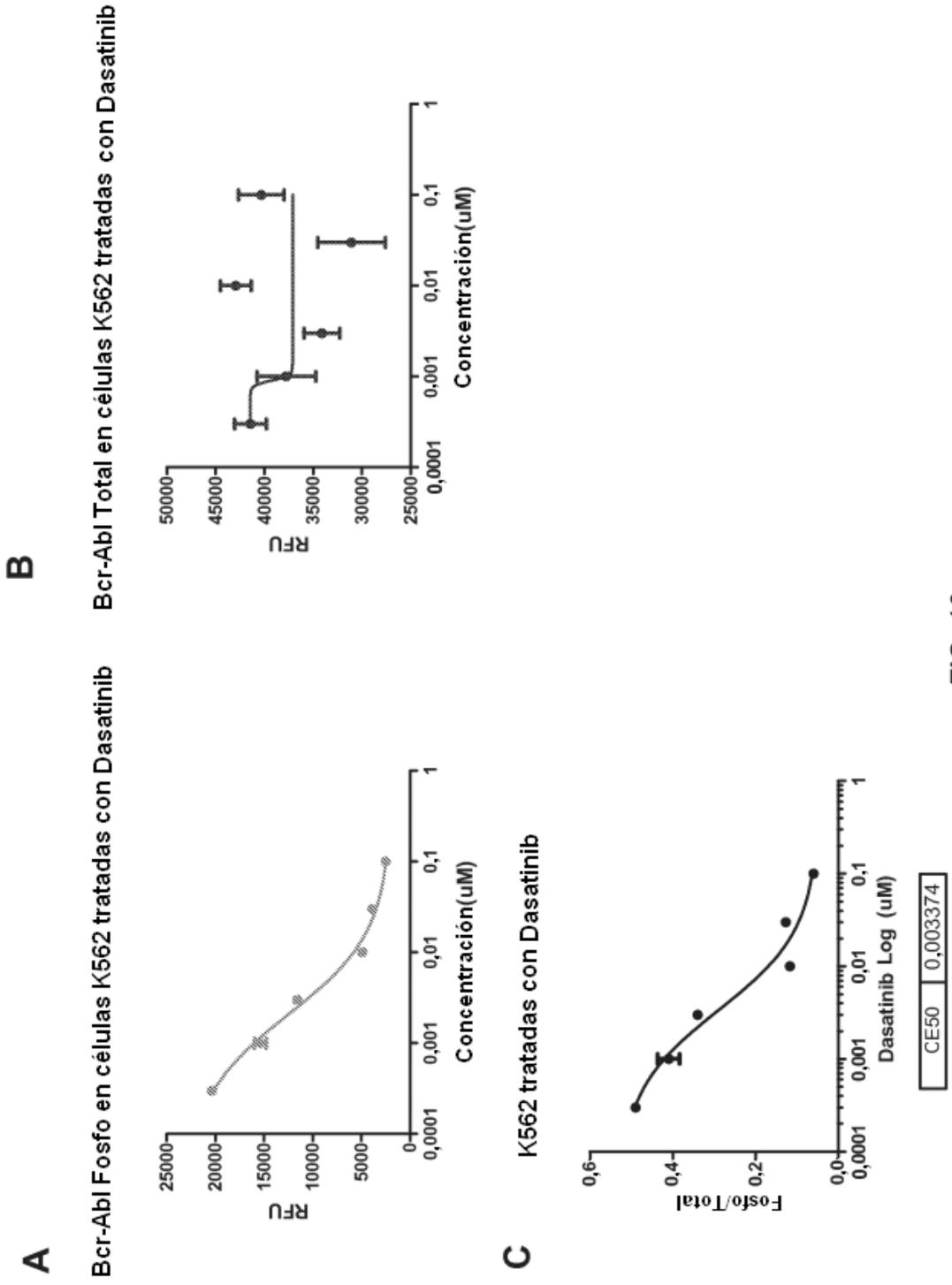


FIG. 16

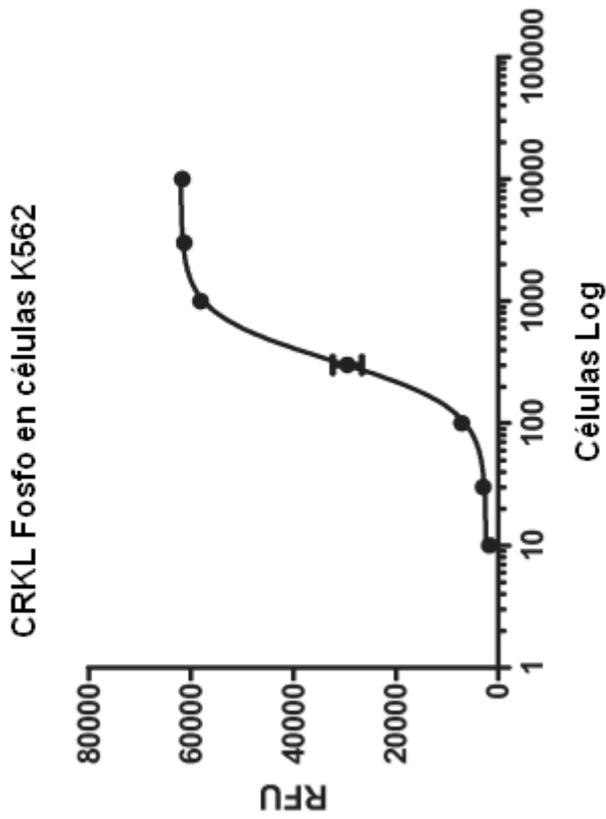
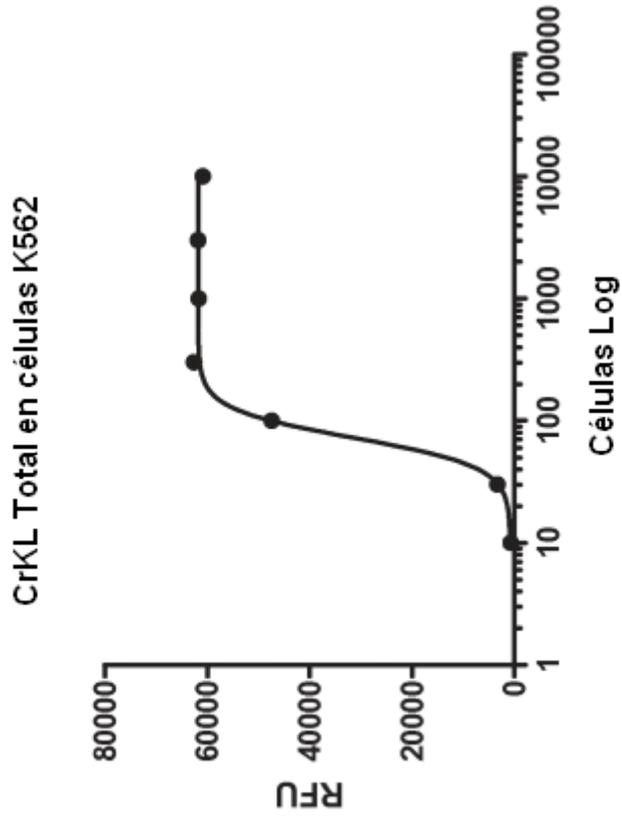


FIG. 17

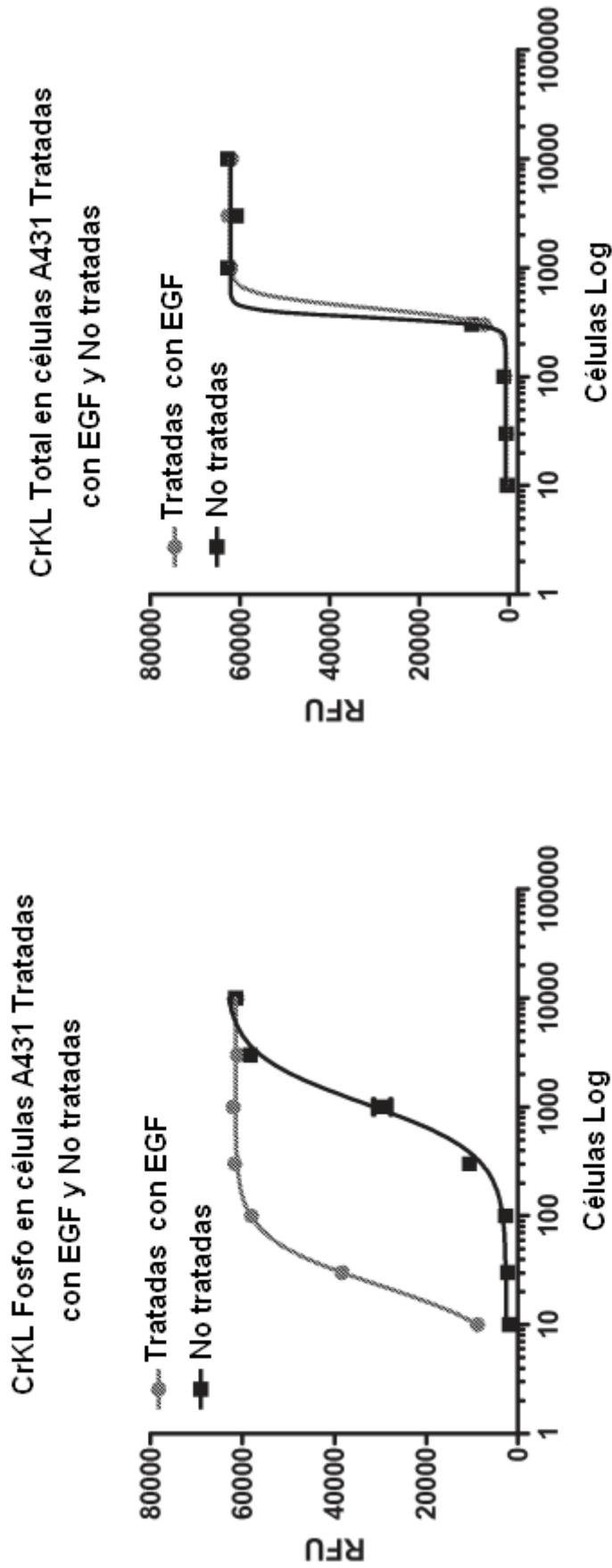


FIG. 18

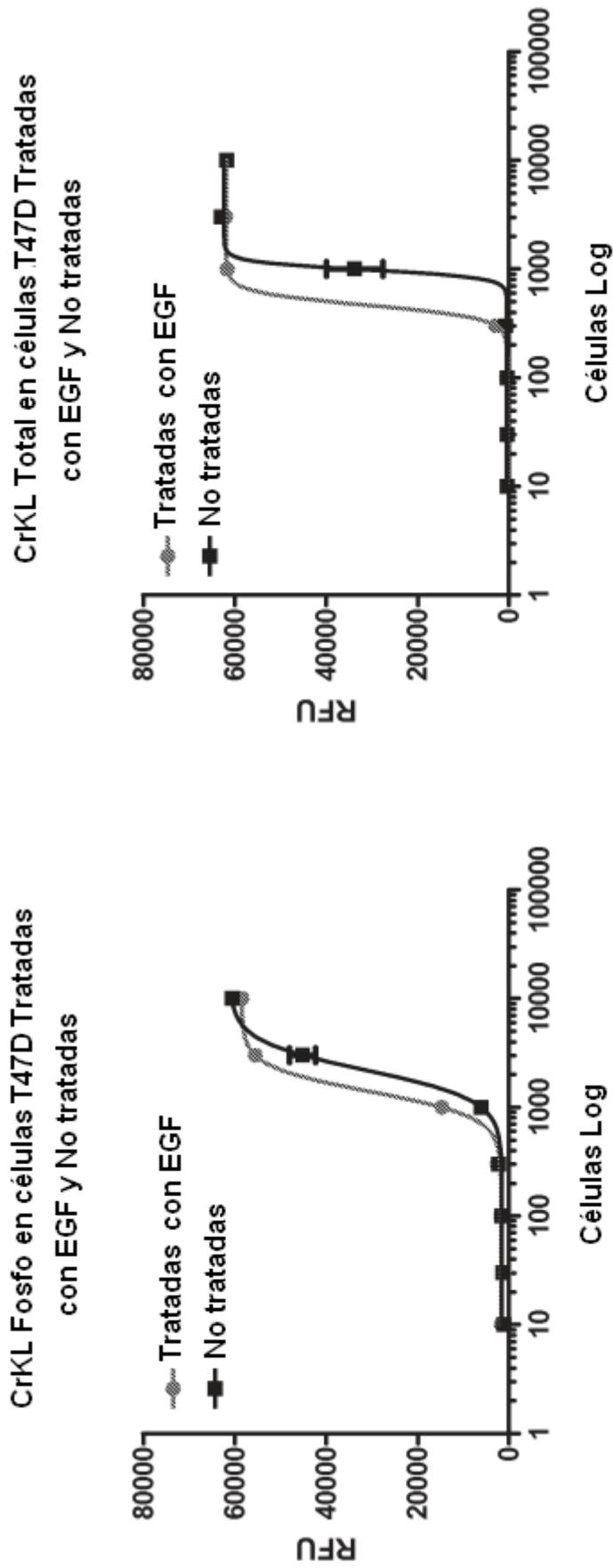


FIG. 19

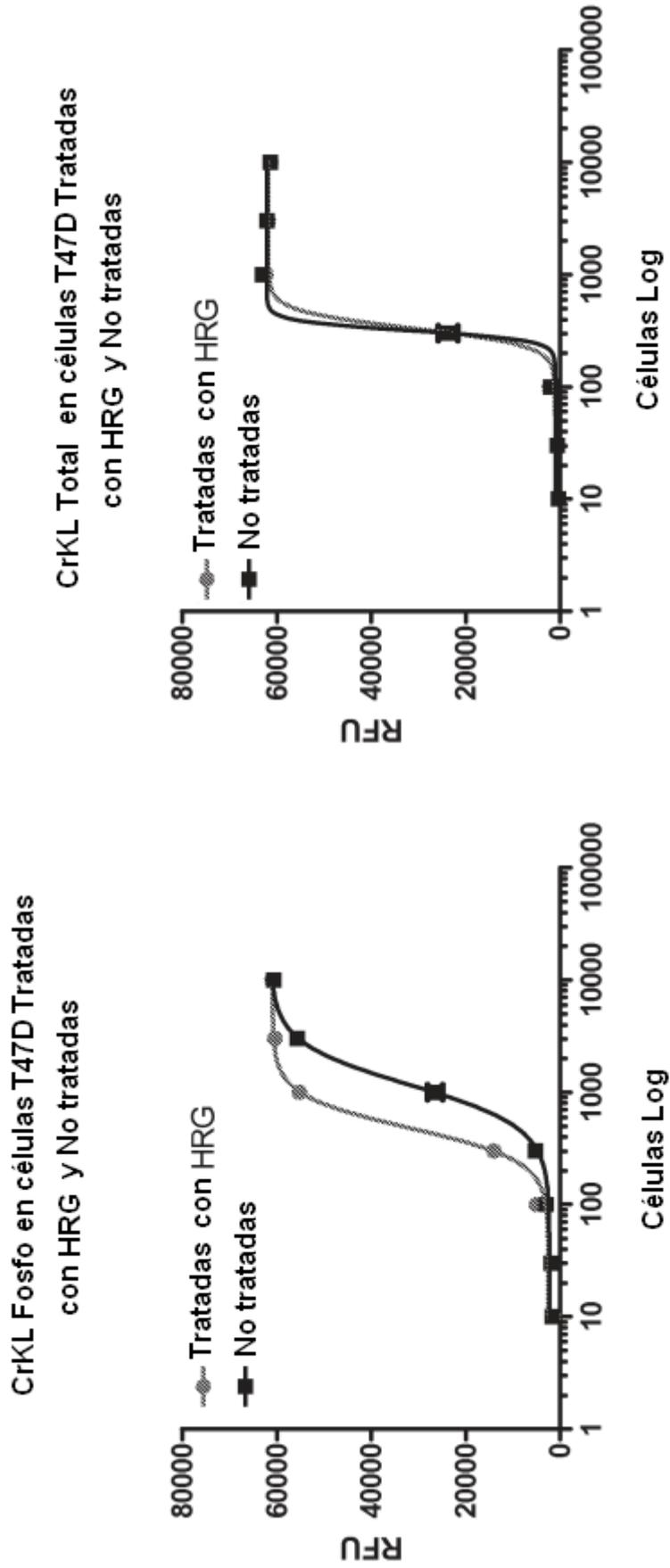


FIG. 20

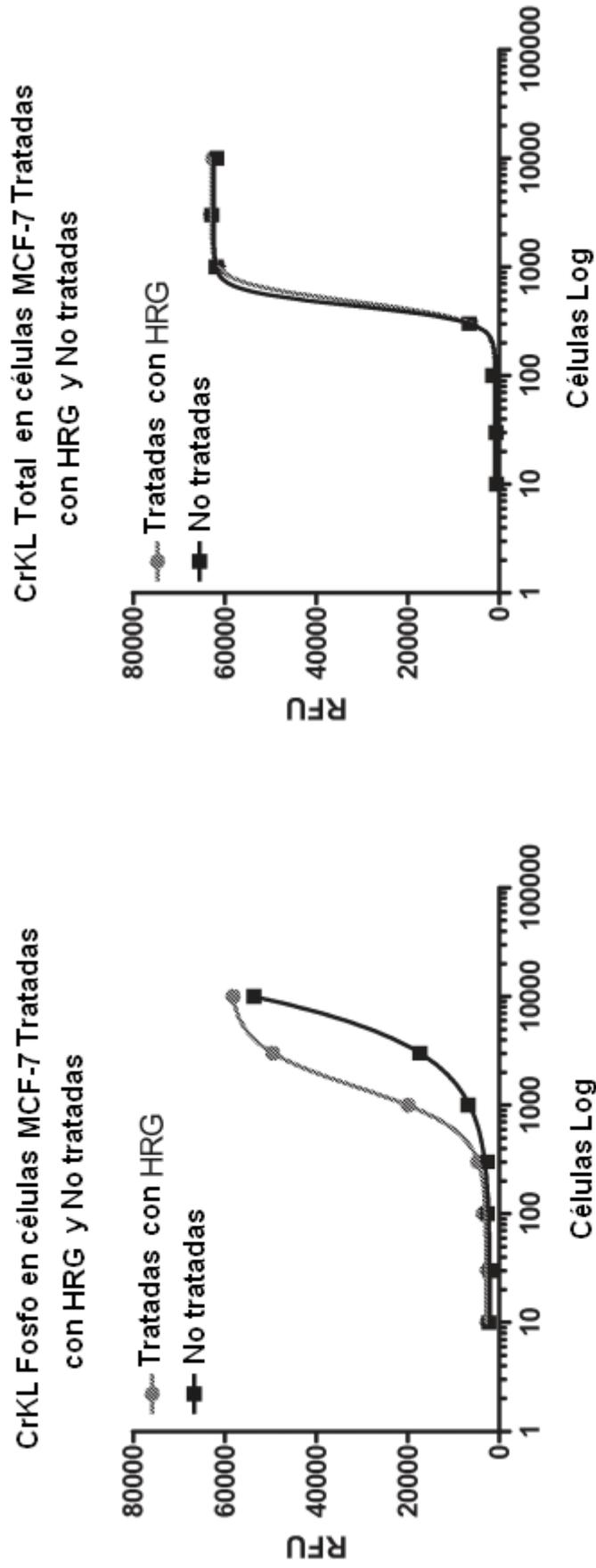


FIG. 21

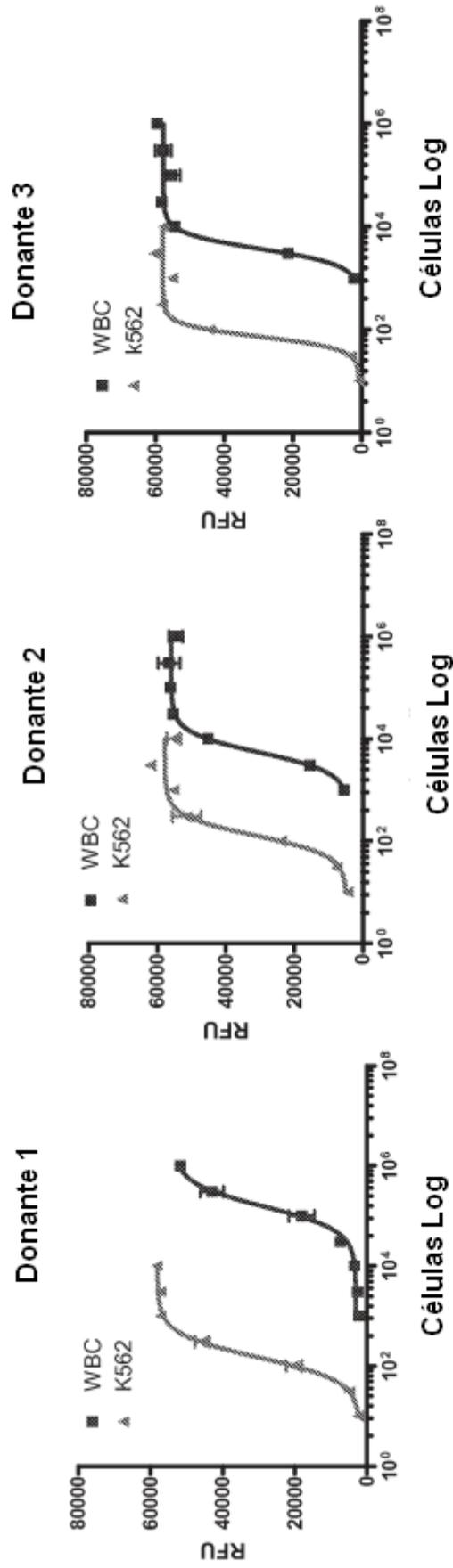


FIG. 22

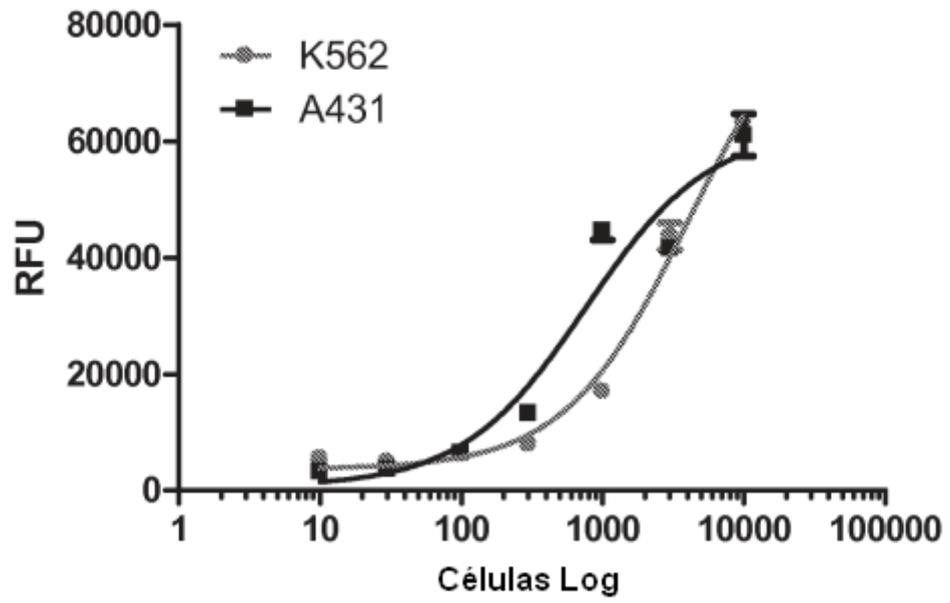


FIG. 23

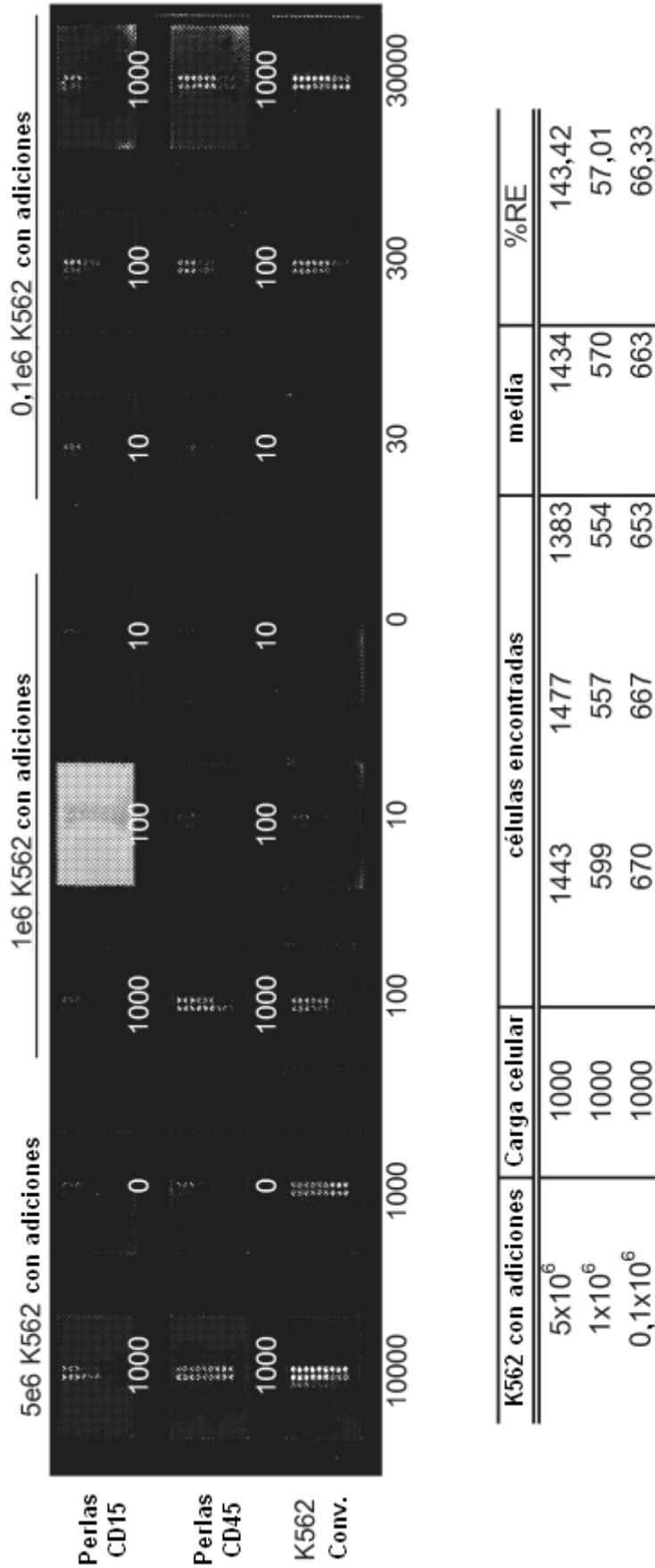
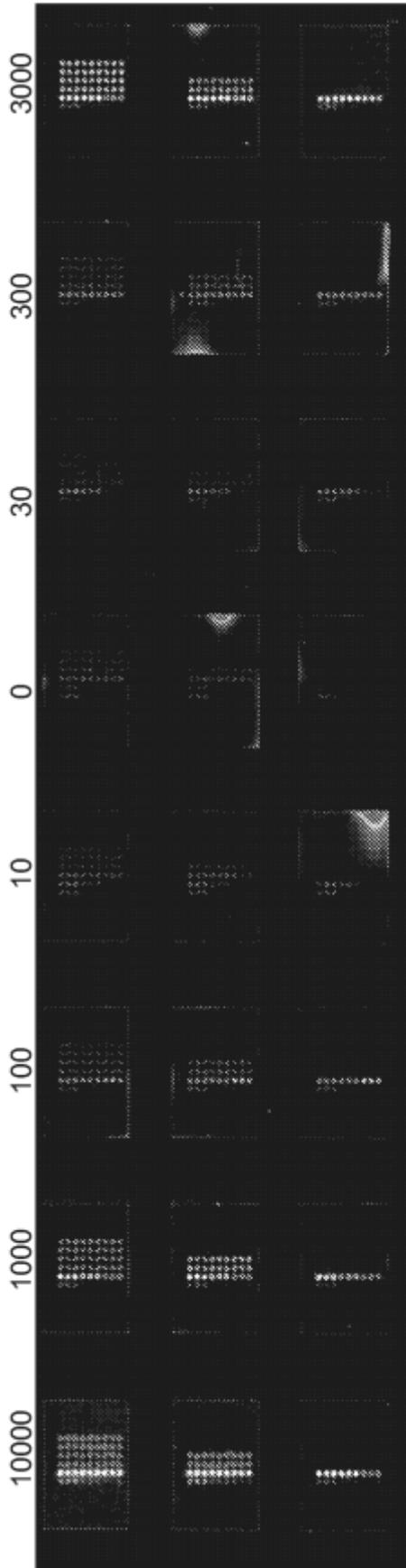


FIG. 24



Ab de Captura: IgG, Bcr N-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal

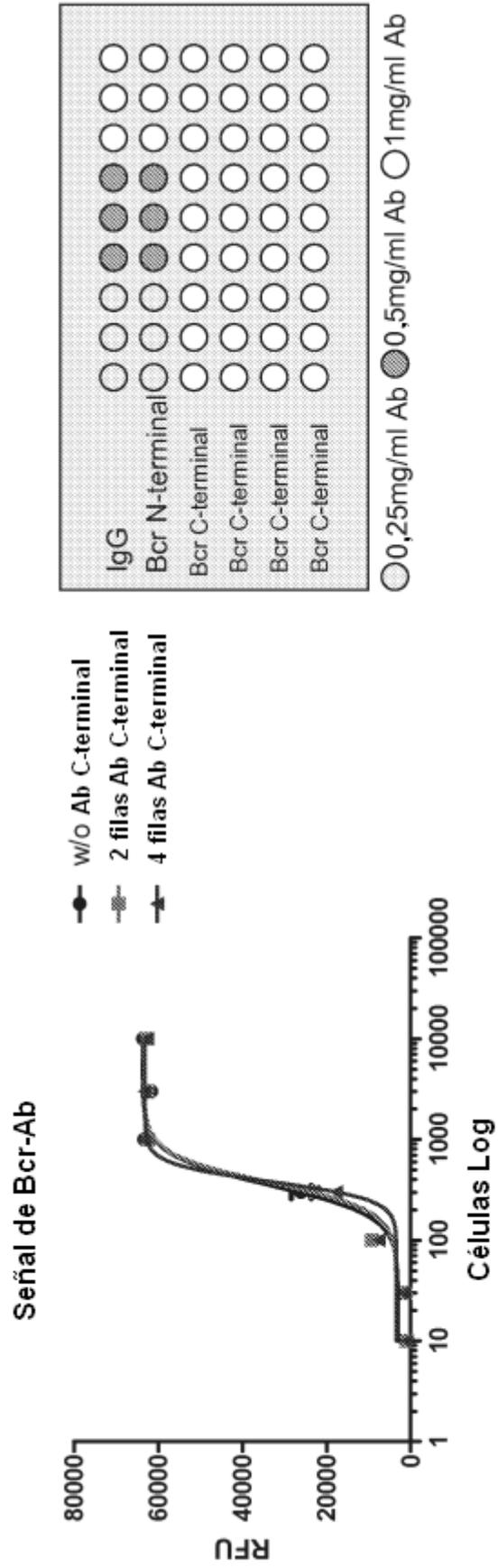
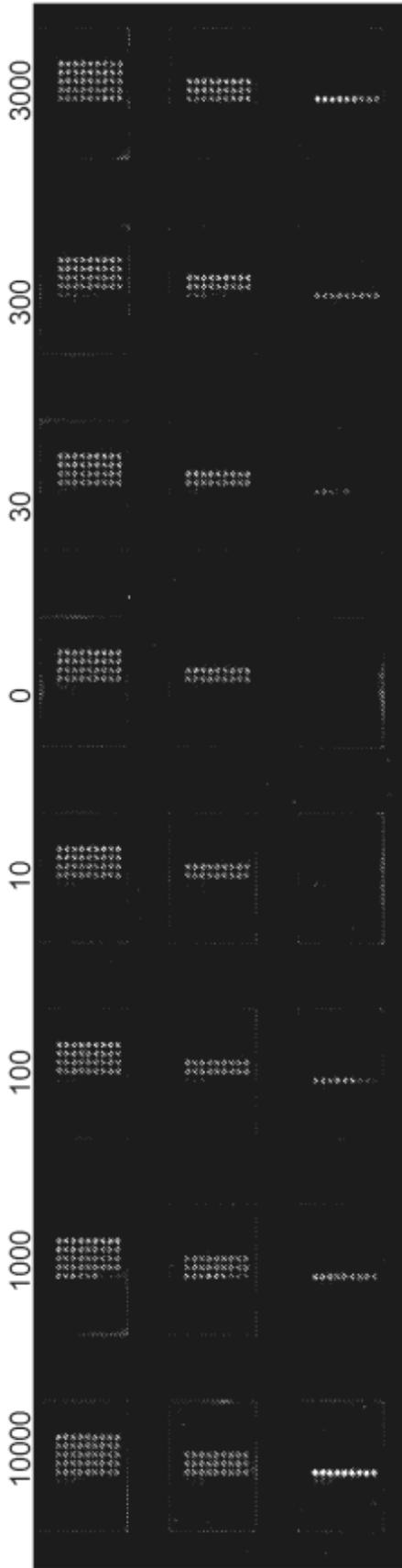


FIG. 25



Ab de Captura: IgG, Bcr N-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal, Bcr C-terminal

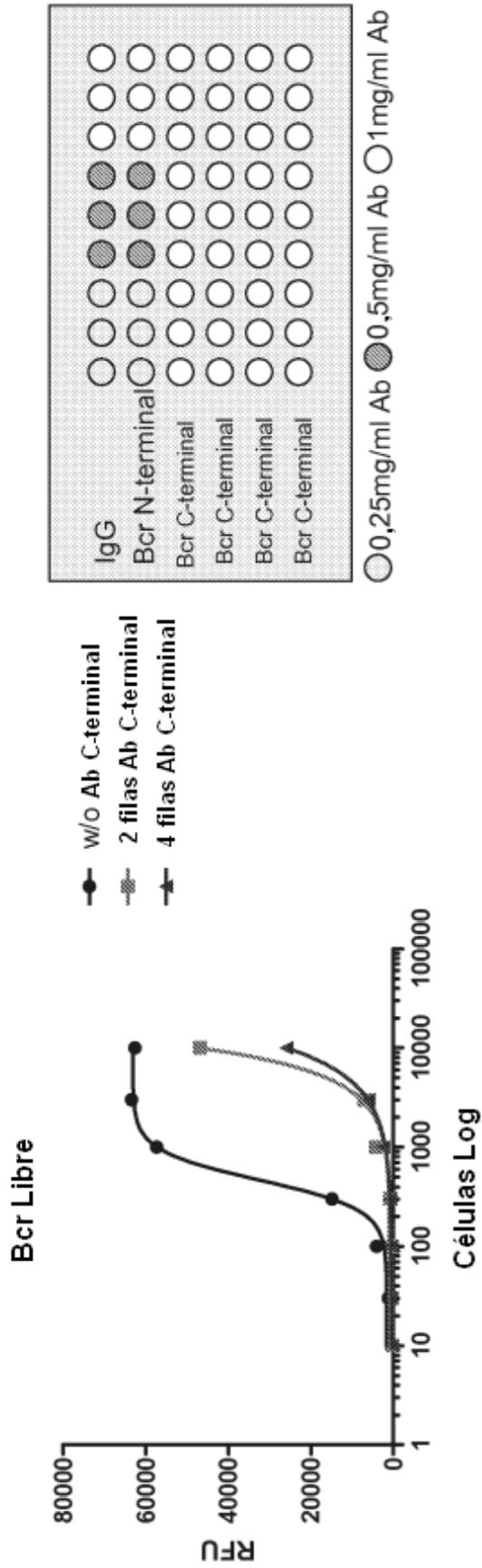


FIG. 26