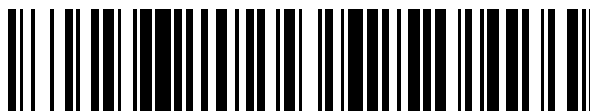


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 674**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)
G06F 19/10 (2011.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
G06F 19/12 (2011.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G06F 19/18 (2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2011** **PCT/US2011/032935**
87 Fecha y número de publicación internacional: **27.10.2011** **WO11133477**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2011** **E 11772505 (1)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2561368**

54 Título: **Composiciones y métodos para la predicción de la sensibilidad y de la resistencia a fármacos, y de la progresión de una enfermedad**

30 Prioridad:

15.02.2011 US 443146 P
08.12.2010 US 421178 P
18.06.2010 US 356495 P
19.04.2010 US 325717 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.01.2018

73 Titular/es:

BIOMARKER STRATEGIES, LLC. (100.0%)
15601 Crabbs Branch Way
Rockville, MD 20855, US

72 Inventor/es:

CLARK, DOUGLAS P.;
SCHAYOWITZ, ADAM y
CABRADILLA, CIRILO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 650 674 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

Composiciones y métodos para la predicción de la sensibilidad y de la resistencia a fármacos, y de la progresión de una enfermedad

5

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La invención se refiere, en general, a la predicción de la respuesta a fármacos y al control de un cuadro clínico en un sujeto y, más específicamente, a la estratificación funcional de células cancerosas y a perfiles de señalización de células cancerosas después de la modulación.

15 Información sobre antecedentes

Las muestras patológicas tradicionales se han procesado en gran medida utilizando métodos que implican la destrucción de las células utilizando técnicas de procesamiento que comprometen la integridad biológica de la muestra. Dichos métodos generalmente se realizan en un laboratorio lejos del centro de atención sanitaria. Estos métodos tradicionales no permiten analizar células vivas, incluidos los biomarcadores dinámicos de células vivas, y no permiten realizar un procesamiento rápido de la muestra o generar resultados analíticos en el centro de atención sanitaria o cerca del mismo. Esta falta de información completa y obtenida rápidamente puede impedir que los médicos identifiquen el régimen de tratamiento adecuado o, que al menos, se ralentice el proceso, lo que afecta negativamente a la calidad de vida del paciente.

25 Por ejemplo, los oncólogos disponen de una mayor cantidad de opciones de tratamiento, que incluyen diferentes combinaciones de fármacos que se caracterizan como un tratamiento de referencia, y diversos fármacos que no llevan una etiqueta que indique un cáncer en particular, pero para los cuales existen pruebas de eficacia en ese cáncer. La mejor probabilidad de un buen resultado de tratamiento requiere la asignación de los pacientes al tratamiento óptimo disponible para el cáncer, y que esta asignación se realice con la mayor celeridad posible después del diagnóstico.

Mientras que algunos cánceres comienzan a subclasificarse y a tratarse utilizando marcadores genómicos, no se dispone de marcadores genómicos fiables para todos los cánceres, que puedan caracterizarse mejor como que muestren expresión anómala de uno o (típicamente) muchos genes normales. Los ensayos de biomarcadores actualmente disponibles para diagnosticar determinados tipos de cáncer y evaluar la efectividad probable de diferentes estrategias de tratamiento basadas en la expresión génica, pueden tener una o más desventajas, por ejemplo: (1) pueden diseñarse ensayos para analizar sangre y no adaptarse fácilmente para ensayos de tumores sólidos; (2) los métodos de preparación de muestras para muestras de tumores sólidos, pueden ser inadecuados para manipular células vivas o realizar mediciones posteriores de la expresión del marcador; (3) muestras pequeñas, obtenidas, por ejemplo, utilizando biopsias con aguja fina, pueden no proporcionar suficiente tejido para realizar un análisis completo; (4) los ensayos pueden requerir el cultivo *in vitro* de las células, períodos de incubación prolongados y/o demoras significativas entre el momento en el que se obtienen las células a analizar del paciente y el tiempo en el que se analizan dichas células, dando lugar a una posible variación y a influencias externas en la expresión del marcador; (5) los ensayos pueden ser inadecuados para medir la expresión de una multiplicidad de genes, fosfoproteínas u otros marcadores en paralelo, lo que puede ser crítico para reconocer y caracterizar la expresión como anómala; (6) puede ser que los ensayos no sean cuantitativos, basándose principalmente en inmunohistoquímica para determinar la presencia o ausencia de una proteína en comparación con niveles de expresión relativa de genes; (7) las condiciones de manipulación de los reactivos y de las células no están estrictamente controladas, lo que conduce a un alto grado de variabilidad entre los ensayos y entre los laboratorios; (8) los ensayos pueden ser inadecuados para analizar niveles de ácido nucleico, debido a la inestabilidad de las moléculas de ácido nucleico y a la dificultad práctica de obtener muestras suficientemente recientes de los pacientes; y (9) los ensayos pueden implicar la fijación de las células antes de que se pueda realizar cualquier análisis de expresión génica, *por ejemplo*, en presencia o ausencia de reactivos seleccionados.

55 Recientemente, varios grupos han publicado estudios concernientes a la clasificación de diversos tipos de cáncer por análisis de expresión génica con micromatrices (véase, *por ejemplo*, Golub et al., Science 286: 531-537 (1999); Bhattacharjee et al., Proc Nat Acad... Sci. USA 98: 13790-13795 (2001); Chen-Hsiang et al., Bioinformatics 17 (Suppl.1): S316-S322 (2001); Ramaswamy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1514915154 (2001)). También se ha recurrido a determinadas clasificaciones de cánceres de mama humanos basadas en patrones de expresión génica (Martin et al., Cancer Res. 60: 2232-2238 (2000); West et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11462 -11467 (2001); Sorlie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 1086910874 (2001); Yan et al., Cancer Res. 61: 8375 - 8380 (2001)). Sin embargo, estos estudios se centran principalmente en mejorar y refinar la clasificación ya establecida de varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, y generalmente no proporcionan nuevos conocimientos sobre las relaciones de los genes expresados diferencialmente o la información celular funcional. Estos estudios no vinculan los hallazgos con las estrategias de tratamiento para mejorar el resultado clínico de la terapia del cáncer, y no abordan el problema de mejorar y estandarizar las técnicas de manipulación y análisis celular existentes.

65

Aunque la biología molecular y la bioquímica modernas han revelado más de 100 genes cuyas actividades influyen en el comportamiento de las células tumorales, en el estado de su diferenciación y en su sensibilidad o resistencia frente a determinados fármacos terapéuticos, con algunas excepciones, el estado de estos genes ha sido insuficiente con el fin de tomar decisiones clínicas rutinarias sobre los tratamientos farmacológicos. Una excepción notable es el uso de la expresión de la proteína receptora de estrógenos (RE) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes para el tratamiento con fármacos antiestrógenos, tales como tamoxifeno. Otro ejemplo excepcional es el uso de la expresión de la proteína ErbB2 (Her2) en carcinomas de mama para seleccionar pacientes con el fármaco HERCEPTIN® antagonista de Her2. (Genentech, Inc., South San Francisco, California). Sin embargo, para la mayoría de los cánceres, las patologías en la expresión génica pueden ser sutiles y pueden implicar patrones de expresión de genes múltiples o la expresión de genes en respuesta a estímulos particulares.

Una respuesta de una célula tumoral a un fármaco terapéutico específico no solo depende de la presencia de la diana, sino también de la multitud de moléculas, y de sus variantes, dentro de la red de señalización. La expresión "biomarcador *ex vivo*" define una nueva clase de biomarcadores que han sido producidos por células tumorales vivas después de haberse extraído del paciente. En el contexto de los biomarcadores moleculares, esto se refiere al proceso de extracción de células viables de un paciente a través de la recogida de sangre periférica o de médula ósea, durante cirugía, de células tumorales circulantes, o a través de una biopsia mínimamente invasiva, tal como una biopsia aspirativa con aguja fina (AAF). La muestra viable se estimula después *in vitro*. En aplicaciones de oncología, estos estímulos pueden ser factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico, que son relevantes para las redes de transducción de señales dirigidas por nuevos fármacos terapéuticos. Los propios biomarcadores pueden representar cualquier biomolécula dinámica, pero pueden ser fosfoproteínas o ARNm recientemente expresados en la red de señalización. Los sucesos celulares que se producen rápidamente (minutos) después de la estimulación *ex vivo*, tales como los sucesos de fosforilación de proteínas, pueden considerarse "proximales" al estímulo y pueden ser más valiosos para determinar las rutas de transducción de señales dominantes utilizadas por el tumor. Los sucesos que se producen más tarde, después de la estimulación *ex vivo* (de minutos a horas), tales como nueva transcripción de ARNm, pueden considerarse marcadores "distales" y pueden ser más útiles para evaluar una visión compuesta de los sucesos de transducción de señales y su impacto sobre funciones celulares tales como proliferación o apoptosis. Los paneles multiplexados de dichas fosfoproteínas, o micromatrices de expresión génica, pueden facilitar la generación de perfiles funcionales integrales que son distintos, y más informativos, que los perfiles generados a partir de tejidos fijos. En algunos casos, el efecto de un agente dirigido molecularmente (MTA, *molecularly targeted agent*) en la ruta podría controlarse *ex vivo* estimulando la muestra en presencia de un modulador, tal como un inhibidor de la ruta química o el propio MTA. En general, los biomarcadores *ex vivo* ofrecen la posibilidad de realizar ensayos funcionales que examinan redes enteras de transducción de señales. Dichos ensayos ofrecen varias aplicaciones posibles, que incluyen la estratificación del paciente basada en información funcional para informar sobre el diseño del ensayo clínico o la gestión clínica y nuevos ensayos farmacodinámicos para su uso en el desarrollo de terapias dirigidas. (Clark DP. Biomarcadores *ex vivo*: herramientas funcionales para guiar el desarrollo y la terapia de fármacos específicos. Expert Rev Mol Diagn 2009; 9 (8): 787-94).

Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar composiciones y métodos mejorados para diagnosticar patologías y determinar la sensibilidad de las células cancerosas al fármaco, basándose en perfiles de estratificación y/o señalización funcionales. El documento WO2007 / 143183 detalla análisis que evalúan la respuesta tumoral a uno o más agentes, incluida la evaluación de la modificación postraduccional y la expresión de proteínas específicas. Farrington *et al.*, 2007 (Desarrollo y validación de un ensayo de estimulación *ex vivo* de la proteína SMAD fosforilada) detallan un método para medir los efectos posteriores de la inhibición de la señalización de TGFβ canónica utilizando estimulación *ex vivo* de tejido sustitutivo para predecir la respuesta tumoral.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que los perfiles de estratificación y/o señalización funcional pueden usarse para diagnosticar o pronosticar un cuadro clínico, para determinar la resistencia o la sensibilidad a fármacos de las células cancerosas, para controlar una enfermedad o capacidad de respuesta a un agente terapéutico y/o para predecir un resultado terapéutico para un sujeto. En este documento se proporcionan métodos para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades caracterizadas por un tumor sólido en pacientes. También se proporcionan métodos que evalúan la resistencia o la sensibilidad de enfermedades caracterizadas por un tumor sólido a agentes terapéuticos dirigidos antes del inicio del régimen terapéutico y para controlar los efectos terapéuticos del régimen terapéutico. El objeto para el que se busca protección es como se define en las reivindicaciones.

Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un método para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad caracterizada por un tumor sólido que comprende: determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una clase de proteínas en una muestra de células y el nivel o estado de las proteínas después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo* dentro de un cartucho en un sistema automatizado para producir perfiles de señalización funcionales y fijar las células, en el que la diferencia se expresa como un valor utilizado para crear perfiles de señalización funcionales que estratifican las muestras en grupos funcionales mediante un

ordenador, que indica la presencia, la ausencia o el riesgo de tener una enfermedad o que indica el pronóstico, y en el que la proteína se modifica por una modificación postraducciona que es una fosforilación. Preferiblemente, la muestra contiene células viables (vivas).

- 5 En una realización, la muestra tumoral se obtiene por biopsia aspirativa con aguja fina, con aguja gruesa, de células tumorales circulantes o de una muestra de tejido extirpado quirúrgicamente. En otra realización, el método incluye además exponer la muestra a un agente terapéutico o a una combinación de los mismos. En otra realización más, la etapa de determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una molécula en la muestra se realiza con un ordenador. En otra realización más, la molécula se analiza utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis bioplex, luminex, espectrometría de masas LC, citometría de flujo, RIA, transferencia Northern, transferencia Southern, transferencia Western y PCR.

- 15 La descripción proporciona un método para predecir el efecto de un agente o combinación de agentes. El método incluye determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una molécula en una muestra y el nivel o estado de la molécula después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*, en el que la diferencia en el nivel o estado basal de la molécula expresada como un valor es indicativo de un efecto positivo o negativo del agente. En una realización, la molécula es una proteína o una molécula de ácido nucleico. En otra realización, la molécula incluye una molécula de proteína, ácido nucleico, lípido, azúcar, hidrato de carbono o metabolito. En otra realización, el agente interacciona directamente con la molécula en la muestra. En otra realización, el efecto es la activación o inhibición de una ruta celular seleccionada del grupo que consiste en una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica. En otra realización más, la etapa de determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una molécula en la muestra se realiza con un ordenador. En otra realización más, la molécula se analiza utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis multiplex, bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Northern, transferencia Southern, transferencia Western, PCR y RIA.

- 30 La descripción también proporciona un método para controlar una enfermedad o capacidad de respuesta a un agente terapéutico, régimen terapéutico o ciclo de terapia para un sujeto. El método incluye determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una molécula en una muestra y el nivel o estado de la molécula después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*, opcionalmente antes, simultáneamente o después del agente terapéutico, régimen terapéutico o ciclo de terapia; donde la diferencia en el nivel o estado basal de la molécula expresada como un valor, es indicativo de un tratamiento positivo o negativo.

- 35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para controlar una enfermedad o ciclo de terapia para un sujeto. El método incluye determinar, con un ordenador, la diferencia entre un nivel o estado basal de una clase de proteínas en una muestra de células y el nivel o estado de las proteínas después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo* dentro de un cartucho en un sistema automatizado para producir perfiles de señalización funcionales antes, simultáneamente o después de un ciclo de terapia; en el que la diferencia en el nivel o estado basal de las proteínas, que se expresa en el ordenador como un valor utilizado para crear perfiles de señalización funcionales que estratifican las muestras en grupos funcionales, indica un tratamiento positivo o negativo, en el que un tratamiento positivo indica que el sujeto responde al ciclo de la terapia o un tratamiento negativo indica que el sujeto tiene resistencia al ciclo de la terapia, en el que la proteína es una proteína modificada por modificación postraducciona que es una fosforilación y en la que la enfermedad es un tumor sólido. En otra realización más, la proteína se analiza utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis multiplex, bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Southern y RIA.

- 50 En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de selección de agentes de ensayo para detectar un efecto sobre una molécula. El método incluye poner en contacto una muestra, que contiene la molécula o las moléculas, con el agente de ensayo *ex vivo*, determinar después una diferencia entre un nivel o estado basal de la molécula en la muestra y el nivel o estado de la molécula después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*; en el que una diferencia en el nivel o estado basal de la molécula antes y después de la puesta en contacto con el agente de ensayo es indicativa de un efecto sobre la molécula. En una realización, la circuitería de señalización funcional se evalúa para predecir el efecto de dos agentes de ensayo en combinación. En otra realización, la muestra se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, ascitis, saliva, orina, sudor, lágrimas, semen, suero, plasma, líquido amniótico, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, una línea celular, un xenoinjerto, un tumor, líquido pericárdico y combinaciones de los mismos.

- 60 En una realización, la molécula es una molécula de proteína o de ácido nucleico. En otra realización, la molécula incluye una molécula de proteína, ácido nucleico, lípido, azúcar, hidrato de carbono o metabolito. En otra realización, la molécula activa o inhibe una ruta celular seleccionada del grupo que consiste en una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica. Los ejemplos de agentes de ensayo incluyen, pero sin limitación, una molécula química pequeña, un agente quimioterapéutico, una hormona, una proteína, un péptido, un peptidomimético, una proteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, una molécula de ARNi y una molécula antisentido. En otra realización más, la etapa

de determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una molécula en la muestra se realiza con un ordenador. En otra realización más, la molécula se analiza utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis multiplex, bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Northern, transferencia Southern, transferencia Western, PCR y RIA.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la estratificación de pacientes basado en la capacidad de respuesta a un agente o régimen terapéutico. El método incluye determinar, con un ordenador, la diferencia entre un nivel o estado basal de una clase de proteínas en una muestra de células de un sujeto y el nivel o estado de las proteínas después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo* dentro de un cartucho en un sistema automatizado para producir señalización funcional; en el que la diferencia en el nivel o estado basal de las proteínas, que se expresa en el ordenador como un valor utilizado para crear perfiles de señalización funcionales que estratifican las muestras en grupos funcionales, indica una respuesta positiva o negativa a un agente o régimen terapéutico, en el que una respuesta positiva indica que el sujeto responde al agente o régimen terapéutico o una respuesta negativa indica que el sujeto tiene resistencia al agente o régimen terapéutico, en el que la proteína es una proteína modificada por modificación postraduccional que es una fosforilación, en el que el agente o régimen terapéutico es para un sujeto que se está tratando de un tumor sólido.

Los ejemplos de agentes de ensayo incluyen, pero sin limitación, una molécula química pequeña, un agente quimioterapéutico, una hormona, una proteína, un péptido, un peptidomimético, una proteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, una molécula de ARN y una molécula antisentido. En otra realización más, la proteína se analiza utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis multiplex, bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Western y RIA.

La divulgación también proporciona un método para determinar la resistencia o sensibilidad de un fármaco en un sujeto. El método incluye comparar el nivel o estado basal de una molécula en una muestra de un sujeto con el nivel o estado de la molécula después de la inhibición *ex vivo* en ausencia de un compuesto estimulador. En una realización, la molécula es una molécula de proteína o de ácido nucleico. En otra realización, la molécula incluye una molécula de proteína, ácido nucleico, lípido, azúcar, hidrato de carbono o metabolito.

En varios aspectos, la muestra se selecciona del grupo que consiste en tejido, sangre, ascitis, saliva, orina, sudor, lágrimas, semen, suero, plasma, líquido amniótico, líquido pleural, líquido cefalorraquídeo, una línea celular, un xenoinjerto, un tumor, líquido pericárdico y combinaciones de los mismos. En varios aspectos, la muestra tumoral puede incluir cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de esófago, de estómago, de pulmón, de próstata, cancer uterino, mamario, de piel, endocrino, urinario, de páncreas, de ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, hígado, hueso, tracto biliar, intestino delgado, hematopoyético, vaginal, testicular, anal, riñón, cerebro, ocular, leucemia, linfoma, de tejido blando, melanoma y metástasis de los mismos.

Como ejemplos de enfermedades se incluyen, pero sin limitación, ictus, enfermedad cardiovascular, trastorno pulmonar obstructivo crónico, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía, miocarditis, cardiopatía isquémica, enfermedad de la arteria coronaria, choque cardiogénico, choque vascular, hipertensión pulmonar, edema pulmonar (incluido el edema pulmonar cardiogénico), cáncer, enfermedad mediada por patógenos, derrame pleural, artritis reumatoide, retinopatía diabética, retinosis pigmentaria y retinopatías, incluida la retinopatía diabética y la retinopatía del prematuro, enfermedades inflamatorias, restenosis, edema (incluido el edema asociado a situaciones patológicas, tales como cánceres y edema inducido por intervenciones médicas tales como la quimioterapia), asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda o en adultos (ARDS), lupus, filtración vascular, rechazo de trasplante (tal como trasplante de órgano, trasplante agudo o heteroinjerto u homoinjerto (como se emplea en el tratamiento de quemaduras)); protección contra lesión isquémica o por reperusión, tal como lesión isquémica o por reperusión contraída durante un trasplante de órgano, inducción de tolerancia al trasplante; lesión isquémica o por reperusión después de una angioplastia; artritis (tal como artritis reumatoide, artritis psoriásica o artrosis); esclerosis múltiple; enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn; lupus (lupus eritematoso sistémico); enfermedades de injerto contra huésped; enfermedades de hipersensibilidad mediadas por linfocitos T, incluyendo hipersensibilidad por contacto, hipersensibilidad de tipo retardado y enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca); diabetes de tipo 1; psoriasis; dermatitis por contacto (incluida la debida a la hiedra venenosa); tiroiditis de Hashimoto; Síndrome de Sjogren; Hipertiroidismo autoinmunitario, tal como la enfermedad de Graves; enfermedad de Addison (enfermedad autoinmunitaria de las glándulas adrenales); enfermedad poliglandular autoinmunitaria (también conocida como síndrome poliglandular autoinmunitario); alopecia autoinmunitaria; anemia perniciosa; vitíligo; hipopituitarismo autoinmunitario; síndrome de Guillain-Barré; otras enfermedades autoinmunitarias; cánceres, incluyendo aquellos en los que las quinasas, tales como las quinasas de la familia Src, se activan o sobreexpresan, tales como el carcinoma de colon y el timoma, o cánceres en los que la actividad de la quinasa facilita el crecimiento o la supervivencia del tumor; glomerulonefritis, enfermedad del suero; urticaria; enfermedades alérgicas tales como alergias respiratorias (asma, fiebre del heno, rinitis alérgica) o alergias de la piel; micosis fungoide; respuestas inflamatorias agudas (tales como síndrome de dificultad respiratoria aguda o en adultos y lesión por isquemia/reperusión); dermatomiositis; alopecia areata; dermatitis actínica crónica; eccema; enfermedad de Behcet; pustulosis palmoplantar; piodermatitis gangrenosa; síndrome de Sezary; dermatitis atópica; esclerosis sistémica; morfea; isquemia de las extremidades periféricas y enfermedad isquémica de las extremidades; enfermedad ósea tal como osteoporosis, osteomalacia,

hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget y osteodistrofia renal; síndromes de filtración vascular, que incluyen síndromes de filtración vascular inducidos por quimioterapias o inmunomoduladores tales como IL-2; lesión o traumatismo de la médula espinal y del cerebro; glaucoma; enfermedades retinianas, incluida la degeneración macular; enfermedad vitreorretiniana; pancreatitis; vasculosis, incluyendo vasculitis, enfermedad de Kawasaki, tromboangeítis obliterante, granulomatosis de Wegener y enfermedad de Behcet; esclerodermia; preeclampsia; talasemia; Sarcoma de Kaposi; y enfermedad de von Hippel Lindau.

En varios aspectos, el patógeno se selecciona del grupo que consiste en bacterias, hongos, virus, espiroquetas y parásitos. En varios aspectos, el virus se selecciona del grupo que consiste en virus del herpes simple 1 (VHS1), virus del herpes simple 2 (VHS2), virus respiratorio sincitial, virus del sarampión (VS), citomegalovirus humano (CMVH), virus variolovacunal, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y virus de la hepatitis C (VHC).

En diversas realizaciones, el modulador incluye un estimulador o inhibidor. En diversas realizaciones, el modulador se selecciona de un modulador físico, biológico o químico. En diversas realizaciones, el modulador físico o químico incluye un cambio de temperatura, un cambio de densidad, un cambio de pH o un cambio de color. En diversas realizaciones, el modulador incluye factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*), activador tisular del plasminógeno (TPA, *tissue plasminogen activator*), otros factores de crecimiento, o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, la proteína incluye una proteína implicada en una ruta celular seleccionada del grupo que consiste en una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica. En diversas realizaciones, la proteína incluye una proteína implicada en la ruta RAS-RAF-MEK-ERK. En diversas realizaciones, la proteína incluye pErk1/2, pAKT, pP70S6K, pGSK3 α/β , pmTOR, pSrc, pEGFR, pSTAT3, o sus combinaciones.

La invención proporciona un método *ex vivo* para determinar la estratificación funcional de una muestra tumoral viva de un sujeto. El método incluye medir al menos un nivel de fosfoproteína de transducción de señal para crear perfiles de señalización funcionales, *ex vivo*, en ausencia de estimulación del factor de crecimiento o en ausencia de estimulación de la hormona de crecimiento, y, en presencia de un inhibidor y en ausencia del inhibidor. En una realización, el método incluye medir al menos un nivel de fosfoproteína de transducción de señal para crear perfiles de señalización funcionales, *ex vivo*, en respuesta a una estimulación del factor de crecimiento, en presencia de un inhibidor de MEK y en ausencia del inhibidor de MEK. En una realización, el inhibidor incluye un inhibidor de MEK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de BRAF o sus combinaciones. En una realización, la muestra tumoral viva incluye células de cáncer de mama, células de melanoma o células de cáncer de páncreas. En otra realización, la fosfoproteína incluye p-Erk 1/2, p-AKT, p-EGFR, p-Stat3, pP70S6K, pmTOR, pSrc, y/o pGSK3 α/β . En otra realización, la fosfoproteína se selecciona del grupo que consiste en p-Erk 1/2, p-AKT, p-EGFR, p-Stat3, pP70S6K, pmTOR, pSrc, pGSK3 α/β , o una de sus combinaciones. En diversas realizaciones, la fosfoproteína se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en 4EBP1, 4EBP1 pS65,53BP1, ACC S79, ACC1, AIB-1, AKT, AKT S473, AKT T308, AMPK, AMPK T172, Anexina, AR, Bak, BAX, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-xL, Beclina, Bid, BIM, Cadherina-E, Cadherina-N, Cadherina-P, Caspasa 3 Activa, Asp 198 escindida por Caspasa 7, Beta Catenina, Caveolina1, CD31, CDC2, Chk1, Chk1 pSer345, Chk2 (1C12), Chk2 pThr68, cJun P-S73, Claudina7 CLDN7, Colágeno VI, Cox-2, Ciclina B1, Ciclina D1, Ciclina E1, DJ-1, eEF2, eEF2K, EGFR, EGFR Y992, EGFR Y1173, eIF4E, ER-a S118, ERCC1, FAK, Fibronectina, FOX03a, FOX03a S318/321, Gata3, GSK3 S21/S9, GSK3-Beta, HER2 pY1248, IGFBP2, IGFR1b, INPP4B, IRS-1, Jnk2, Kit-c, K-RAS, Ku80, MAPK P-T202/204, MEK1, MEK1 pS217/221, MIG-6, Mre11(31H4), MSH2, MSH6, Myc, NF-kB p65, NF2, Notch 1, Notch3, p21, p27, p27 pT157, p27 pT198, p38 / MAPK, p38 T180/182, p53, p70S6K, p70S6K T389, p90 RSK P-T359/S363, PARP escindida, Paxilina, PCNA, PDK1 P-S241, Pea15, Pea15 pS116, PI3K P110a, PI3K-p85, PKC S657, PKCa, PR, Pras40 pT246, PTCH, PTEN, Rab25, Rad50, Rad51, Raf-A pS299, Raf-B, Raf-C, Raf-c pS388, Rb (4H1), Rb pS807/811, S6 S235/236, S6 S240/244, Shc pY317, Smad3, Snail, Src, Src P-Y527, Src Y416, Stat3 P-S705, Stat5, Estatmina, Tau, Taz, Taz P-Ser79, Telomerasa, Transglutaminasa, Tuberina/TSC2, Vasp, VEGFR2, Xiap, XRCC1, proteína de unión a Y Box 1, YAP, YAP pS127, YB1 pS102, o una de sus combinaciones. En una realización, se identifican al menos dos grupos diferentes de perfiles de señalización funcionales. En otra realización, se identifican al menos cuatro grupos diferentes de perfiles de señalización funcionales. En una realización, la estimulación del factor de crecimiento incluye un ligando del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico. En una realización adicional, el ligando del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico es el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). En diversas realizaciones, el factor de crecimiento incluye Factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), hormona estimuladora de melanocitos, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), PTK7, Trk, Ros, MuSK, Met, Axl, Tie, Eph, Ret Ryk, DDR, Ros, LMR, ALK, STYK1, o una de sus combinaciones.

La divulgación proporciona un método para clasificar sistemas de modelos de células cancerosas. El método incluye (a) medir al menos uno de los niveles de fosfoproteína de transducción de señal con respecto a un grupo de células cancerosas seleccionado; (b) poner en contacto las células cancerosas con al menos un factor de crecimiento o al menos un inhibidor; (c) medir al menos un nivel de fosfoproteína de transducción de señal después de la etapa (b); (d) calcular la puntuación de modulación basada en las mediciones de la etapa(a) y etapa (c); y (e) clasificar las células cancerosas basándose en la puntuación de modulación de la etapa (d). En una realización, el método incluye además la etapa de predecir la resistencia o la sensibilidad a un fármaco de una muestra tumoral viva de un sujeto basándose en la clasificación de la muestra tumoral viva.

- En una realización, las células cancerosas incluyen células de cáncer de mama. En otra realización, las células cancerosas incluyen células de cáncer de mama, células de melanoma o células de cáncer pancreático. En otra realización, la fosfoproteína incluye p-Erk 1/2, p-AKT, p-EGFR, p-Stat3, pP70S6K, pmTOR, pSrc, y/o pGSK3 α/β . En otra realización, la fosfoproteína se selecciona del grupo que consiste en p-Erk 1/2, p-AKT, p-EGFR, p-Stat3, pP70S6K, pmTOR, pSrc, pGSK3 α/β , o una de sus combinaciones. En diversas realizaciones, la fosfoproteína se selecciona de al menos uno del grupo que consiste en 4EBP1, 4EBP1 pS65, 53BP1, ACC S79, ACC1, AIB-1, AKT, AKT S473, AKT T308, AMPK, AMPK T172, Anexina, AR, Bak, BAX, Bcl-2, Bcl-X, Bcl-xL, Beclina, Beclina, Bid, BIM, Cadherina-E, Cadherina-N, Cadherina-P, Caspasa 3 Activa, Asp 198 escindida por Caspasa 7, Beta Catenina, Caveolina1, CD31, CDC2, Chk1, Chk1 pSer345, Chk2 (1C12), Chk2 pThr68, cJun P-S73, Claudina7 CLDN7, Colágeno VI, Cox-2, Ciclina B1, Ciclina D1, Ciclina E1, DJ-1, eEF2, eEF2K, EGFR, EGFR Y992, EGFR Y1173, eIF4E, ER-a S118, ERCC1, FAK, Fibronectina, FOXO3a, FOXO3a S318/321, Gata3, GSK3 S21/S9, GSK3-Beta, HER2 pY1248, IGFBP2, IGFR1b, INPP4B, IRS-1, Jnk2, Kit-c, K-RAS, Ku80, MAPK P-T202/204, MEK1, MEK1 pS217/221, MIG-6, Mre11(31H4), MSH2, MSH6, Myc, NF-kB p65, NF2, Notch 1, Notch3, p21, p27, p27 pT157, p27 pT198, p38 / MAPK, p38 T180/182, p53, p70S6K, p70S6K T389, p90 RSK P-T359/S363, PARP escindida, Paxilina, PCNA, PDK1 P-S241, Pea15, Pea15 pS116, PI3K P110a, PI3K-p85, PKC S657, PKCa, PR, Pras40 pT246, PTCH, PTEN, Rab25, Rad50, Rad51, Raf-A pS299, Raf-B, Raf-C, Raf-c pS388, Rb (4H1), Rb pS807/811, S6 S235/236, S6 S240/244, Shc pY317, Smad3, Snail, Src, Src P-Y527, Src Y416, Stat3 P-S705, Stat5, Estatmina, Tau, Taz, Taz P-Ser79, Telomerasa, Transglutaminasa, Tuberina/TSC2, Vasp, VEGFR2, Xiap, XRCC1, proteína de unión a Y Box 1, YAP, YAP pS127, YB1 pS102, o una de sus combinaciones. En una realización, se identifican al menos dos grupos diferentes de clasificaciones de células cancerosas. En otra realización, se identifican al menos cuatro grupos diferentes de clasificaciones de células cancerosas. En una realización, la estimulación del factor de crecimiento incluye un ligando del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico. En una realización adicional, el ligando del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico es el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). En varios aspectos, el factor de crecimiento incluye factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), hormona estimuladora de melanocitos, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), PTK7, Trk, Ros, MuSK, Met, Axl, Tie, Eph, Ret Ryk, DDR, Ros, LMR, ALK, STYK1, o una de sus combinaciones.
- La divulgación proporciona un método para predecir el resultado de un régimen terapéutico en un sujeto. El método incluye (a) medir el nivel basal de al menos una molécula de al menos una célula de un sujeto que tiene una enfermedad que necesita terapia; (b) exponer la al menos una célula a un modulador *ex vivo*; (c) medir el nivel de al menos una proteína de transducción de señal después de la etapa (b); y (d) comparar la diferencia entre niveles medidos en (a) y (b) con células con propiedades conocidas de resistencia o sensibilidad a fármacos, prediciendo así el resultado del régimen terapéutico en el sujeto.
- La divulgación proporciona un método para predecir la resistencia o sensibilidad a fármacos de las células. El método incluye (a) medir el nivel basal de al menos una molécula de al menos una célula; (b) exponer la al menos una célula a un modulador *ex vivo*; (c) medir el nivel de al menos una proteína de transducción de señal después de la etapa (b); y (d) comparar la diferencia entre los niveles medidos en (a) y (b) con células con propiedades conocidas de resistencia o sensibilidad a fármacos, prediciendo así la resistencia o sensibilidad a fármacos de al menos una célula. En una realización, la célula incluye una célula de melanoma. En otra realización, el fármaco incluye un inhibidor de BRAF. En otra realización, el fármaco incluye un inhibidor de MEK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de BRAF o combinaciones de los mismos.
- En una realización, la al menos una molécula incluye una proteína de transducción de señal. En otra realización, la al menos una célula incluye una muestra tumoral de un sujeto y la medición de los niveles en (a) y (b) se realiza *ex vivo*. En diversas realizaciones, la muestra tumoral es de un tumor sólido. En una realización adicional, la muestra tumoral incluye cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, esofágico, de estómago, pulmón, próstata, uterino, de mama, piel, endocrino, urinario, de páncreas, ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, hígado, hueso, tracto biliar, intestino delgado, hematopoyético, vaginal, testicular, anal, de riñón, de cerebro, ocular, leucemia, linfoma, de tejido blando, melanoma y metástasis de los mismos. En diversas realizaciones, la muestra tumoral se obtiene por biopsia aspirativa con aguja fina, con aguja gruesa, de células tumorales circulantes o de una muestra de tejido extirpado quirúrgicamente.
- En una realización, la resistencia a los fármacos incluye resistencia al inhibidor de BRAF. En otra realización, la al menos una célula incluye una mutación en la proteína serina/treonina quinasa B-Raf (BRAF). En otra realización, la al menos una célula incluye una mutación en BRAF y la amplificación del oncogén de cáncer de tiroides de Osaka (COT, *cancer Osaka thyroid*). En una realización adicional, la mutación en BRAF es V600E.
- La etapa de comparación se realiza con un ordenador. En diversas realizaciones, las mediciones se realizan utilizando un ensayo seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis multiplex, bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Western y RIA.
- La divulgación proporciona un método para clasificar células de melanoma. El método incluye (a) medir un primer nivel basal de al menos una molécula de al menos una célula de melanoma; (b) comparar el primer nivel basal medido en (a) con un segundo nivel basal de la al menos una molécula de células de melanoma con clasificaciones

conocidas, clasificando así la al menos una célula de melanoma. En una realización, la al menos una célula de melanoma incluye una muestra tumoral de un sujeto y el primer nivel basal se mide *ex vivo*. En diversas realizaciones, las clasificaciones incluyen un estado metastásico. En diversas realizaciones, la muestra tumoral se obtiene por biopsia aspirativa con aguja fina, con aguja gruesa, de células tumorales circulantes o de una muestra de tejido extirpado quirúrgicamente.

La divulgación proporciona un método para clasificar células de melanoma. El método incluye (a) medir el nivel basal de al menos una molécula de al menos una célula de melanoma; (b) exponer la al menos una célula de melanoma a un agente de ensayo inhibidor; (c) medir el nivel de la al menos una molécula después de la etapa (b); y (d) comparar la diferencia entre los niveles medidos en (a) y (b) con células de melanoma con clasificaciones conocidas, clasificando así la al menos una célula de melanoma. En una realización, la al menos una célula de melanoma incluye una muestra tumoral de un sujeto y las mediciones se realizan *ex vivo*. En una realización, el agente de ensayo inhibidor incluye un inhibidor de MEK, un inhibidor de mTOR, un inhibidor de BRAF, o combinaciones de los mismos. En otra realización, las clasificaciones incluyen un estado metastásico. En diversas realizaciones, la muestra tumoral se obtiene por biopsia aspirativa con aguja fina, con aguja gruesa, de células tumorales circulantes o de una muestra de tejido extirpado quirúrgicamente.

La divulgación proporciona un método para identificar mecanismos de resistencia a fármacos o mecanismos de derivación de oncogenes de células de melanoma. El método incluye (a) exponer al menos una célula de melanoma a un agente de ensayo inhibidor; (b) medir las reducciones de una pluralidad de moléculas después de la exposición de (a), identificando así mecanismos de resistencia a fármacos o mecanismos de derivación de oncogenes.

En una realización, la al menos una célula de melanoma incluye una muestra tumoral de un sujeto y la medición se realiza *ex vivo*. En diversas realizaciones, la muestra tumoral incluye cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer colorrectal, esofágico, de estómago, pulmón, próstata, uterino, de mama, de piel, endocrino, urinario, de páncreas, de ovario, de cuello uterino, de cabeza y cuello, de hígado, de hueso, de tracto biliar, de intestino delgado, hematopoyético, vaginal, testicular, anal, de riñón, de cerebro, ocular, leucemia, linfoma, de tejido blando, melanoma y metástasis de los mismos. En diversas realizaciones, la al menos una molécula incluye una proteína implicada en una ruta celular seleccionada del grupo que consiste en una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica. En diversas realizaciones, la al menos una molécula incluye una proteína implicada en la ruta RAS-RAF-MEK-ERK. En diversas realizaciones, la al menos una molécula incluye pErk1/2, pAKT, pP70S6k, pGSK3 α/β , pEGFR, pSTAT3, pmTOR, pSrc, o sus combinaciones. En diversas realizaciones, la muestra tumoral se obtiene por biopsia aspirativa con aguja fina, con aguja gruesa, de células tumorales circulantes o de una muestra de tejido extirpado quirúrgicamente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un diagrama gráfico que resume los datos obtenidos de una matriz de fosfoproteínas que contiene 29 fosfoproteínas diferentes.

Las figuras 2A y 2B son perfiles de señalización funcionales de valores iniciales (Figura 2A) y estimulados con EGF (Figura 2B) de un conjunto de cinco líneas celulares de cáncer de mama.

La figura 3 muestra un ejemplo de ilustración de rutas de transducción de señal utilizadas en la presente invención.

La figura 4 muestra un ejemplo de un diagrama de flujo del proceso de la presente invención. Las muestras de tumores vivos se obtienen típicamente de un sujeto y después se aplica al menos una estimulación para desencadenar sucesos de transducción de señales en las muestras tumorales vivas. Se pueden evaluar los niveles iniciales y los niveles estimulados de diversos ARNm o proteínas y después puede determinarse la estratificación funcional.

La figura 5 muestra un ejemplo de ilustración de varias etapas/equipos para aplicar estimulaciones a muestras tumorales vivas de un sujeto.

La figura 6 muestra la estratificación funcional de varias líneas celulares de cáncer de mama. Las cámaras superiores de la izquierda son para AKT. Las cámaras superiores del centro son para Erk. Las cámaras superiores de la derecha son para EGFR. Las cámaras inferiores de la izquierda son para GSK3 β . La cámara inferior del centro es para STAT3. Las cámaras inferiores de la derecha son para P70S6K.

La figura 7 muestra una agrupación jerárquica de líneas celulares ejemplares basada en estratificación funcional.

La figura 8 muestra ejemplos de correlaciones entre líneas celulares monocapa y líneas celulares procesadas (es decir, después de simulación tal como SnapPath[™]).

La figura 9 muestra la correlación entre líneas celulares procesadas y xenoinjerto para HCC-1937.

La figura 10 muestra la correlación entre líneas celulares procesadas y xenoinjerto para MDA-MB-231.

5 La figura 11 muestra un ejemplo de estratificación funcional y una posible correlación de fármacos, en la que se ilustran la sensibilidad al fármaco y el factor de cambio que se induce después de las estimulaciones.

La figura 12 muestra la relación entre la estratificación funcional y las posibles opciones terapéuticas.

10 La figura 13 muestra un ejemplo de ilustración en el que la posible sensibilidad al fármaco está asociada a perfiles de señalización funcionales de TNBC (*Triple-Negative Breast Cancer*, cáncer de mama triple negativo). La fila superior incluye pAKT, pErk y EGFR. La fila inferior incluye pGSK, pSTAT3 y p70S6k.

15 La figura 14 muestra un ejemplo de ilustración en el que es posible la estratificación *ex vivo* y el análisis de circuitería funcional celular a través de la inhibición de fármacos y, por ejemplo, en el sistema SnapPath™. Este análisis incluye pAKT, pErk, pGSK, p70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

20 La figura 15 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de melanoma (modulación) después de estimulación de EGF. Se miden los niveles de proteína para pAKT, pERK, pGSK3, p70S6K, pSTAT, pEGFR en células RPMI-7951, SK-MEL 2, SK-MEL 28 y SK-MEL 31. Los factores de cambio se calculan para el nivel de proteína antes y después de la estimulación con EGF.

25 La figura 16 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de melanoma (inhibición) después de inhibición de MEK por U0126. Se miden los niveles de proteína para pERK, pAKT, pGSK3α/β, p70S6K, pSTAT, EGFR en células RPMI-7951, SK-MEL 2, SK-MEL 28 y SK-MEL 31.

La figura 17 muestra ejemplos de diferenciación de la línea celular RPMI-7951 resistente a PLX-4032, a través de la inducción de pErk después de estimulación con TPA.

30 La figura 18 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de tumor pancreático. Todas las muestras, excepto la 10195, son ejemplos de tumores neuroendocrinos pancreáticos (PanNET) humanos. La muestra 10195 es una muestra de un adenocarcinoma pancreático humano. Los datos revelan diferencias en los perfiles funcionales basados en la estimulación con TPA utilizando tres biomarcadores diferentes de fosfoproteína (p-ERK1/2, p-GSKα/β y p-STAT3).

35 La figura 19 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales (PSF) de líneas celulares de melanoma después de estimulación con TPA en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

40 La figura 20 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales (PSF) de líneas celulares de melanoma después de estimulación con EGF en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3α/β, pP70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

45 La figura 21 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de líneas celulares de melanoma después de inhibición con U0126 en ausencia de EGF en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

50 La figura 22 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de líneas celulares de melanoma después de inhibición con U0126 en presencia de EGF en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

55 La figura 23 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de líneas celulares de melanoma después de estimulación de PDGF-β en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

La figura 24 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de líneas celulares de melanoma después de estimulación de PDGF-β e inhibición de MEK por U0126 en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

60 La figura 25 muestra ejemplos de curvas cinéticas de inhibición de fosfoproteínas en SK-MEL-28, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

65 La figura 26 muestra ejemplos de curvas de respuesta a dosis de inhibición de fosfoproteínas en SK-MEL-28, una línea celular de melanoma después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 27 muestra ejemplos de curvas cinéticas de inhibición de fosfoproteínas en RPMI-7951, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 28 muestra ejemplos de curvas de respuesta a dosis de inhibición de fosfoproteínas en RPMI-7951, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 29 muestra ejemplos de curvas cinéticas de inhibición de fosfoproteínas en SK-MEL-31, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 30 muestra ejemplos de curvas de respuesta a dosis de inhibición de fosfoproteínas en SK-MEL-31, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 31 muestra ejemplos de curvas cinéticas de inhibición de fosfoproteínas en SK-MEL-2, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAk, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 32 muestra ejemplos de curvas de respuesta a dosis de fosfoproteínas en SK-MEL-2, una línea celular de melanoma, después de tratamiento con un inhibidor de BRAF (PLX-4702) en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pGSK3β, pP70S6k y pSTAT3.

La figura 33 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de la línea celular de melanoma (SK-MEL-28) después de estimulación de EGF en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk y pMEK.

La figura 34 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de la línea celular de melanoma (RPMI-7951) después de estimulación de EGF así como de inhibición de BRAF y ERK con PLX-4702 y U0126 en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk y MEK.

La figura 35 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de la línea celular de melanoma (RPMI-7951) después de estimulación de EGF así como de inhibición de BRAF y ERK con PLX-4702 y U0126 en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk, pMEK y pEGFR.

La figura 36 muestra ejemplos de perfiles de señalización funcionales de la línea celular de melanoma (RPMI-7951) después de estimulación de PDGFβ así como de la inhibición de BRAF y ERK con PLX-4702 y U0126 en el instrumento SnapPath™. Los niveles de proteína medidos incluyen pAKT, pErk y pMEK.

Descripción detallada de la invención

Antes de que se describa la presente composición, los presentes métodos y la presente metodología de tratamiento, debe entenderse que esta invención no está limitada a composiciones, a métodos y a condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichas composiciones, métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en este documento tiene únicamente la finalidad de describir realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solo en las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno(a)", "el" y "la", incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias al "método" incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo descrito en este documento, que serán obvias para los expertos en la materia al leer esta descripción y demás.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento se puede utilizar en la práctica o ensayo de la invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos.

La invención proporciona un método seguro, eficaz, certero, preciso, reproducible, económico, rentable, eficiente, rápido y conveniente para recoger, manipular y procesar especímenes celulares *ex vivo*. Estos métodos pueden mantener la viabilidad de las muestras durante el proceso para mantener la integridad de los biomarcadores y, opcionalmente, producir biomarcadores, tales como fosfoproteínas y moléculas de ácido nucleico, no presentes en la muestra original a través de estimulación y/o inhibición *ex vivo*. La invención proporciona un tratamiento de la información y de los especímenes, totalmente integrado en un sistema de laboratorio de citología de diagnóstico completo y condiciones controladas posteriores a una biopsia, lo que minimiza la variabilidad entre ensayos,

minimiza el riesgo de biocontaminación y minimiza el efecto del propio proceso de preparación de muestras sobre la expresión de biomarcadores.

- 5 Las realizaciones de la presente invención pueden utilizarse para facilitar el tratamiento dirigido de enfermedades, y opcionalmente proporcionar también una evaluación de adecuación de la muestra tisular, tal como un recuento celular, una función celular y/u otros análisis relacionados.

10 Como apreciará un experto en la materia, los dispositivos, sistemas, kits y métodos descritos en este documento proporcionan numerosas ventajas en un entorno clínico o de investigación. Por ejemplo, se pueden utilizar para proporcionar un procesamiento de biopsias rápido, cerca del paciente, sin la necesidad de enviar el espécimen a un laboratorio lejano. También se pueden utilizar para estandarizar y automatizar el procesamiento de la biopsia de una manera rentable. La presente invención puede proporcionar información molecular más detallada sobre las células que la que permiten los procesos patológicos actuales, lo que permite una mayor subclasificación de las células en una biopsia (por ejemplo, células cancerosas o enfermas), opcionalmente utilizando nuevos biomarcadores *ex vivo*.
15 Consideradas conjuntamente, las ventajas de la presente invención permiten realizar un diagnóstico rápido cerca del centro de atención sanitaria y la posterior creación de regímenes de tratamiento, específicos del paciente, que sean más eficaces.

20 Debe entenderse que los métodos de la invención se pueden realizar en solitario o junto con los sistemas y dispositivos establecidos en la Publicación de Estados Unidos No. 2009/0162853.

25 La invención proporciona métodos para realizar el diagnóstico y/o el pronóstico de una enfermedad en un sujeto. Además, los métodos de la invención son capaces tanto de evaluar la sensibilidad o resistencia de una enfermedad de un paciente a un agente antes de iniciar la terapia como de supervisar los efectos de la terapia durante el tratamiento. El ensayo de diagnóstico dirige la terapia y determina el pronóstico de los pacientes tratados con terapias dirigidas.

30 Por consiguiente, la invención proporciona un método para realizar el diagnóstico y/o el pronóstico de una enfermedad en un sujeto de acuerdo con la reivindicación 1. El método incluye determinar la diferencia entre un nivel o estado inicial de una proteína en una muestra y el nivel o estado de la proteína después de la estimulación de una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*, en el que la diferencia se expresa como un valor que indica la presencia, la ausencia o el riesgo de tener una enfermedad.

35 Los ejemplos de moduladores incluyen, pero sin limitación, moduladores físicos, biológicos o químicos. En el término "moduladores" se incluyen estimuladores e inhibidores, tales como moléculas pequeñas (por ej., erlotinib, gefitinib o lapatanib) y anticuerpos (por ej. HERCEPTIN®). En una realización, el modulador es un inhibidor o activador del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Como se usa en el presente documento, el término "EGFR" se refiere a productos de la familia de genes *erbB*. Los expertos en la materia entenderán que el EGFR puede ser un producto de cualquier receptor de *erbB* codificado por cualquier gen de la familia de genes *erbB*, y cualquier homo- y heterodímero que se sabe que forman estas moléculas. Si bien el producto *erbB*-1 es el receptor principal, cuya expresión se ha detectado en estudios previos, hay motivos para creer que las líneas celulares y los tumores analizados en la presente memoria también expresan otros miembros de la familia de genes *erbB*. Por último, el ligando de EGFR o la combinación de ligandos que utilizamos se unen a casi todas las formas conocidas de receptores de EGFR, y por lo tanto, nuestro ensayo mide los efectos ejercidos por esas proteínas. En otra
40 realización, el modulador es una combinación de uno o más moduladores, tales como, por ejemplo, uno o más de EGF, TGF- α y Herregulina.

45 Por lo tanto, el efecto cuantitativo o cualitativo medido puede ser el nivel de expresión de un gen, tal como un miembro de la familia de genes tempranos inmediatos o tardíos. Como miembros de la familia de genes tempranos inmediatos o tardíos adecuados se incluyen, pero sin limitación, FOS, JUN y DUSP 1-28.

50 Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se usa en sentido amplio, para referirse a cualquier afección patológica de una parte, órgano o sistema de un sujeto que se origina por diversas causas, tales como infección, defecto genético o estrés ambiental, y se caracteriza por un grupo de señales o síntomas identificables. Como ejemplos de enfermedades se incluyen, pero sin limitación, ictus, enfermedad cardiovascular, trastorno pulmonar obstructivo crónico, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, miocardiopatía, miocarditis, cardiopatía isquémica, enfermedad de la arteria coronaria, choque cardiogénico, choque vascular, hipertensión pulmonar, edema pulmonar (incluido el edema pulmonar cardiogénico), cáncer, enfermedad
55 mediada por patógenos, derrame pleural, artritis reumatoide, retinopatía diabética, retinosis pigmentaria y retinopatías, incluida la retinopatía diabética y la retinopatía del prematuro, enfermedades inflamatorias, restenosis, edema (incluido el edema asociado a situaciones patológicas, tales como cánceres y edema inducido por intervenciones médicas tales como la quimioterapia), asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda o en adultos (ARDS), lupus, filtración vascular, rechazo de trasplante (tal como trasplante de órgano, trasplante agudo o heteroinjerto u homoinjerto (como se emplea en el tratamiento de quemaduras)); protección contra lesión isquémica o por reperfusión, tal como lesión isquémica o por reperfusión contraída durante un trasplante de órgano, inducción de tolerancia al trasplante; lesión isquémica o por reperfusión después de una angioplastia; artritis (tal como artritis
60 65

reumatoide, artritis psoriásica o artrosis); esclerosis múltiple; enfermedad inflamatoria intestinal, que incluye colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn; lupus (lupus eritematoso sistémico); enfermedades de injerto contra huésped; enfermedades de hipersensibilidad mediadas por linfocitos T, incluyendo hipersensibilidad por contacto, hipersensibilidad de tipo retardado y enteropatía sensible al gluten (enfermedad celíaca); diabetes de tipo 1; psoriasis; dermatitis por contacto (incluida la debida a la hiedra venenosa); tiroiditis de Hashimoto; Síndrome de Sjogren; Hipertiroidismo autoinmunitario, tal como la enfermedad de Graves; enfermedad de Addison (enfermedad autoinmunitaria de las glándulas adrenales); enfermedad poliglandular autoinmunitaria (también conocida como síndrome poliglandular autoinmunitario); alopecia autoinmunitaria; anemia perniciosa; vitíligo; hipopituitarismo autoinmunitario; síndrome de Guillain-Barré; otras enfermedades autoinmunitarias; cánceres, incluyendo aquellos en los que las quinasas, tales como las quinasas de la familia Src, se activan o sobreexpresan, tales como el carcinoma de colon y el timoma, o cánceres en los que la actividad de la quinasa facilita el crecimiento o la supervivencia del tumor; glomerulonefritis, enfermedad del suero; urticaria; enfermedades alérgicas tales como alergias respiratorias (asma, fiebre del heno, rinitis alérgica) o alergias de la piel; micosis fungoide; respuestas inflamatorias agudas (tales como síndrome de dificultad respiratoria aguda o en adultos y lesión por isquemia/reperfusión); dermatomiositis; alopecia areata; dermatitis actínica crónica; eccema; enfermedad de Behcet; pustulosis palmoplantar; piodermitis gangrenosa; síndrome de Sezary; dermatitis atópica; esclerosis sistémica; morfea; isquemia de las extremidades periféricas y enfermedad isquémica de las extremidades; enfermedad ósea tal como osteoporosis, osteomalacia, hiperparatiroidismo, enfermedad de Paget y osteodistrofia renal; síndromes de filtración vascular, que incluyen síndromes de filtración vascular inducidos por quimioterapias o inmunomoduladores tales como IL-2; lesión o traumatismo de la médula espinal y del cerebro; glaucoma; enfermedades retinianas, incluida la degeneración macular; enfermedad vitreoretiniana; pancreatitis; vasculosis, incluyendo vasculitis, enfermedad de Kawasaki, tromboangéitis obliterante, granulomatosis de Wegener y enfermedad de Behcet; esclerodermia; preeclampsia; talasemia; Sarcoma de Kaposi; y enfermedad de von Hippel Lindau.

En una realización, la enfermedad es cáncer. Como ejemplos de cánceres se incluyen, pero sin limitación, cáncer colorrectal, esofágico, de estómago, pulmón, próstata, uterino, de mama, de piel, endocrino, urinario, de páncreas, de ovario, de cuello uterino, de cabeza y cuello, de hígado, de hueso, de tracto biliar, de intestino delgado, hematopoyético, vaginal, testicular, anal, de riñón, de cerebro, ocular, leucemia, linfoma, de tejido blando, melanoma y metástasis de los mismos.

En otra realización, la enfermedad es una enfermedad mediada por patógenos. Como ejemplos de patógenos se incluyen, pero sin limitación, bacterias, hongos, virus, espiroquetas y parásitos. Como ejemplos de virus se incluyen, pero sin limitación, virus del herpes simple 1 (VHS1), virus del herpes simple 2 (VHS2), virus respiratorio sincitial, virus del sarampión (VS), citomegalovirus humano (CMVH), virus variolovacunal, virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y virus de la hepatitis C (VHC).

Como se usa en este documento, el término "muestra" y la expresión "muestra biológica" se refieren a cualquier muestra que sea adecuada para realizar los métodos proporcionados en la presente invención. Una muestra de células utilizada en el presente método se puede obtener de muestras tisulares o de líquidos corporales de un sujeto, o de un tejido obtenido mediante un procedimiento de biopsia (p. ej., una biopsia con aguja) o mediante un procedimiento quirúrgico. Por lo tanto, como ejemplos de muestras se incluyen, pero sin limitación, una muestra tisular, una muestra tisular congelada, un espécimen de biopsia, un espécimen quirúrgico, un espécimen citológico, una línea celular, un xenoinjerto, un tumor, una aspiración con aguja fina, sangre entera, médula ósea, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido linfático, suero, plasma, líquido amniótico, moco, plasma, orina, quilo, heces, esputo, sudor, lágrimas, semen, aspirado de pezón, saliva y cualquier combinación de estos. En ciertas realizaciones, la muestra puede ser una fracción de una muestra de sangre tal como una fracción de linfocitos de sangre periférica (PBL, *peripheral blood lymphocyte*). En la técnica se conocen bien métodos para aislar PBL de sangre entera. Además, es posible utilizar una muestra de sangre y enriquecer la pequeña cantidad de células circulantes de un tejido de interés, *por ejemplo*, ovarios, mama, etc., utilizando métodos conocidos en la técnica.

La aspiración con aguja fina (AAF) ha demostrado ser un método potente y seguro para adquirir material tumoral en cantidades suficientes para evaluar en serie los criterios de valoración farmacodinámicos. Además, se proporcionan pruebas preliminares que sugieren que esta metodología puede utilizarse de manera eficiente en la obtención de tejido para reproducir condiciones *in vitro* y desarrollar ensayos de sensibilidad y resistencia molecular *ex vivo*. Este enfoque ha despertado un considerable interés desde un punto de vista clásico y el resultado y significado fundamental de varios de estos estudios ha sido objeto de recientes revisiones. La mayoría de los estudios analizaron si las células procedentes de una muestra de tejido tumoral viable mostraban una respuesta cuando se exponían a agentes terapéuticos seleccionados en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, en una realización, el ensayo se basó en la aspiración con aguja fina de cualquier lesión y en el procesamiento del material aspirado para realizar un análisis de proteínas y/o de ácidos nucleicos. Dependiendo del agente farmacéutico particular utilizado, el ensayo permite la determinación de la sensibilidad de la lesión al tratamiento, la efectividad del bloqueo de rutas específicas, y la supervisión de los efectos de la terapia a nivel molecular. El ensayo puede realizarse con una morbilidad y molestia mínimas, y se puede utilizar para evaluar la sensibilidad a los fármacos, el régimen de dosificación, la medición del efecto de la terapia y el pronóstico.

Plataforma SnapPath™ para biomarcadores *Ex Vivo*: las biopsias aspirativas con aguja fina (BAAF) son un método mínimamente invasivo para el muestreo de tumores humanos que se utiliza generalizadamente en los Estados Unidos. Históricamente, las muestras de BAAF han proporcionado un material adecuado para el análisis microscópico, sin embargo, el desarrollo y el uso satisfactorios de fármacos dirigidos contra el cáncer también requerirán información de los biomarcadores procedentes de estas muestras clínicas.

Aunque los biomarcadores *ex vivo* se han utilizado satisfactoriamente en diversos ensayos clínicos que utilizan manipulación manual de tejido vivo en la cabecera del paciente, los ensayos *ex vivo* no son clínicamente fiables a menos que exista un dispositivo de procesamiento rápido y automatizado, tal como SnapPath™. La capacidad de investigar células tumorales vivas con nuevos ensayos de biomarcadores *ex vivo* para determinar el tratamiento más efectivo para el cáncer de pacientes individuales resulta ser prometedora con la plataforma para biomarcadores SnapPath™.

Las unidades de sobremesa SnapPath™ utilizarán tecnologías fluidicas automatizadas para procesar y manipular muestras de biopsias de tumores vivos, dentro de cartuchos insertables de diseño exclusivo. En el sistema SnapPath™, los radiólogos depositarán muestras de biopsia (AAF) en un cartucho SnapPath™ inmediatamente después de extraer la aguja del paciente. Los cartuchos se entregarán rápidamente para estudiar la patología donde se ubicará la plataforma SnapPath™, en un proceso similar al requerido para muestras de linfoma procesadas por citometría de flujo.

La plataforma para biomarcadores SnapPath™ se está desarrollando con un contrato SBIR (Small Business Innovation Research) Fast-Track (de 2,3 millones de dólares del *National Cancer Institute*. En la adjudicación del contrato del NCI, la agencia declaró que la tecnología SnapPath™ de la compañía presentó un enfoque e instrumento de biopsia AAF "innovadores" que fue "extremadamente receptivo" al anuncio del contrato del NCI que expresó interés en "instrumentos y dispositivos de biopsia que preservan perfiles moleculares en tumores", incluidos los que "crearán un área de diagnóstico completamente nueva" y "permitirán la terapia molecular individualizada de tumores sólidos basándose en información precisa sobre rutas de transducción de señales, dianas farmacológicas moleculares y biomarcadores". El NCI también declaró recientemente que las tecnologías enfocadas en el diagnóstico *ex vivo* y análisis de tejidos *ex vivo* son una "prioridad" para el programa Bridge Award en Fase II SBIR del NCI.

El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier individuo o paciente al que se realizan los métodos objeto. Generalmente, el sujeto es un ser humano, aunque como apreciarán los expertos en la materia, el sujeto puede ser un animal. De este modo, en la definición de sujeto, se incluyen otros animales, incluidos mamíferos tales como roedores (incluidos ratones, ratas, hámsteres y cobayas), gatos, perros, conejos, animales de granja, incluidas vacas, caballos, cabras, ovejas, cerdos, etc., y primates (incluidos monos, chimpancés, orangutanes y gorilas). Además, el término "sujeto" puede referirse a un cultivo de células, donde los métodos de la invención se realizan *in vitro* para evaluar, por ejemplo, la eficacia de un agente terapéutico.

Como se usa en este documento, los términos "molécula" o "biomolécula" se refieren a cualquier molécula orgánica en un organismo vivo. Como ejemplos de biomoléculas se incluyen, pero sin limitación, péptidos, lípidos, ácidos nucleicos, metabolitos e hidratos de carbono. En una realización, la biomolécula es un péptido, tal como una proteína, o una molécula de ácido nucleico. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente memoria para referirse a dos o más restos de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales, los que contienen restos modificados, y a polímeros de aminoácidos no naturales.

En el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico" se utiliza generalizadamente para referirse a una secuencia de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos que están unidos entre sí mediante un enlace fosfodiéster. Como tal, la expresión "molécula de ácido nucleico" pretende incluir ADN y ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, así como híbridos de ADN/ARN. Además, la expresión "molécula de ácido nucleico" como se usa en el presente documento incluye moléculas de ácido nucleico naturales, que pueden aislarse de una célula, por ejemplo, un gen particular de interés, así como moléculas sintéticas, que pueden prepararse, por ejemplo, por métodos de síntesis química o por métodos enzimáticos tales como mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, en diversas realizaciones, pueden contener análogos de nucleótidos o un enlace de cadena principal distinto de un enlace fosfodiéster.

Como se usa en este documento, la expresión "modulador de EGFR" se refiere a un compuesto o fármaco que es una molécula biológica o una molécula pequeña que modula directa o indirectamente la actividad de EGFR o la ruta de transducción de señal de EGFR. Los compuestos o fármacos como se usan en este documento pretenden incluir tanto moléculas pequeñas como moléculas biológicas. La modulación directa o indirecta incluye la activación o inhibición de la actividad de EGFR o la ruta de transducción de señal de EGFR. La inhibición se refiere a la inhibición de la unión de EGFR con un ligando de EGFR, que incluye, por ejemplo, EGFR. Además, la inhibición también puede referirse a la inhibición de la actividad quinasa de EGFR.

Los moduladores de EGFR incluyen, por ejemplo, ligandos específicos de EGFR, inhibidores de EGFR de molécula pequeña y anticuerpos monoclonales de EGFR. En un aspecto, el modulador de EGFR inhibe la actividad de EGFR y / o inhibe la ruta de transducción de señal de EGFR. En otro aspecto, el modulador de EGFR es un anticuerpo de EGFR que inhibe la actividad de EGFR y / o inhibe la ruta de transducción de señal de EGFR.

Los moduladores de EGFR incluyen moléculas biológicas o moléculas pequeñas. Las moléculas biológicas incluyen todos los lípidos y polímeros de monosacáridos, aminoácidos y nucleótidos que tienen un peso molecular superior a 450. Por lo tanto, las moléculas biológicas incluyen, por ejemplo, oligosacáridos, polisacáridos, oligopéptidos, polipéptidos, péptidos, proteínas, oligonucleótidos y polinucleótidos. Los oligonucleótidos y polinucleótidos incluyen, por ejemplo, ADN y ARN. Las moléculas biológicas incluyen adicionalmente derivados o una combinación de cualquiera de las moléculas descritas anteriormente. Por ejemplo, los derivados de moléculas biológicas incluyen lípidos y derivados de glicosilación de oligopéptidos, polipéptidos, péptidos y proteínas.

Además de las moléculas biológicas comentadas anteriormente, los moduladores de EGFR útiles en la invención también pueden ser moléculas pequeñas. En el presente documento, cualquier molécula que no sea una molécula biológica se puede considerar que es una molécula pequeña. Algunos ejemplos de moléculas pequeñas incluyen compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos, sacáridos, aminoácidos y nucleótidos. Las moléculas pequeñas incluyen además moléculas que de otro modo serían consideradas moléculas biológicas, excepto que su peso molecular no es mayor que 450. Así, las moléculas pequeñas pueden ser lípidos, oligosacáridos, oligopéptidos y oligonucleótidos y sus derivados, que tienen un peso molecular de 450 o menor.

Se observa que las moléculas pequeñas simplemente se denominan moléculas pequeñas porque típicamente tienen pesos moleculares menores que 450. Las moléculas pequeñas incluyen compuestos que se encuentran en la naturaleza así como compuestos sintéticos. En una realización, el modulador de EGFR es una molécula pequeña que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan EGFR. En otra realización, el modulador de EGFR es una molécula pequeña que inhibe el crecimiento de células tumorales refractarias que expresan EGFR. Se han descrito numerosas moléculas pequeñas como útiles para inhibir EGFR y son muy conocidas en la técnica.

La divulgación también incluye micromatrices especializadas, por ejemplo, micromatrices de oligonucleótidos o micromatrices de ADNc, que comprenden uno o más biomarcadores, que muestran perfiles de expresión que se correlacionan con sensibilidad o resistencia a una o más estimulaciones, por ejemplo, moduladores de EGFR. Dichas micromatrices pueden emplearse en ensayos *in vitro* para evaluar el nivel de expresión de los biomarcadores en las células de ensayo de biopsias de tumor, y determinar si estas células de ensayo son probablemente resistentes o sensibles a estimulaciones, por ejemplo, a moduladores de EGFR. Las muestras de células o de tejido vivo de un sujeto se pueden aislar y exponer a una o más de las estimulaciones, por ejemplo, a los moduladores de EGFR. Después de la aplicación de ácidos nucleicos aislados de células tratadas y no tratadas a una o más de las micromatrices especializadas, el patrón de expresión génica de las células probadas puede determinarse y compararse con el patrón de biomarcadores del panel de control de células utilizadas para crear el biomarcador establecido en la micromatriz. En función de los resultados del patrón de expresión génica de las células que se sometieron al ensayo, puede determinarse si las células muestran un perfil de expresión génica resistente o sensible.

La divulgación también incluye kits para determinar o predecir si un paciente sería susceptible o resistente a un tratamiento que incluye una o más estimulaciones, por ejemplo, moduladores de EGFR. El paciente puede tener un cáncer o un tumor tal como, por ejemplo, un cáncer de mama o un tumor. Dichos kits serían útiles en un entorno clínico para su uso en un ensayo de muestras de cáncer de un paciente, por ejemplo, para determinar o predecir si el tumor o cáncer del paciente será resistente o sensible a un tratamiento o a una terapia determinados. El kit incluye un envase adecuado que incluye una o más micromatrices, por ejemplo, micromatrices de oligonucleótidos o micromatrices de cDNA, que incluyen los biomarcadores que se correlacionan con la resistencia y la sensibilidad a estímulos, por ejemplo moduladores de EGFR, particularmente inhibidores de EGFR; una o más estimulaciones, por ejemplo moduladores de EGFR para uso en ensayos de muestras de cáncer o células de un paciente; e instrucciones de uso. Además, los kits contemplados por la invención pueden incluir también, por ejemplo, reactivos o materiales para controlar la expresión de biomarcadores de la invención a los niveles de ARNm o proteínas, utilizando otras técnicas y sistemas practicados en la técnica tales como, por ejemplo, ensayos de RT-PCR, que emplean cebadores diseñados en función de uno o más de los biomarcadores, inmunoensayos, tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), inmunotransferencia, por ejemplo, *transferencias* Western, o hibridación *in situ*, y similares.

En otra realización, los métodos incluyen además exponer la muestra a uno o más agentes terapéuticos o a una combinación de los mismos. Para tumores sólidos u otras aplicaciones de cáncer, los agentes terapéuticos pueden incluir un agente farmacéutico específico tal como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales antitumorales, por ejemplo, trastuzumab (Herceptin®), cetuximab (Erbix®), bevacizumab (Avastin®) y rituximab (Rituxan® y / o Mabthera®), e inhibidores de moléculas pequeñas, por ejemplo, gefitinib (Iressa®) o erlotinib (Tarceva®) o agentes quimioterapéuticos citotóxicos.

Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos también incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos, tales como metotrexato, agentes reticulantes de ADN, tales como cisplatino/carboplatino; agentes alquilantes, tales como canbusil; inhibidores de topoisomerasa I tales como dactinomicina; inhibidores de microtúbulos tales como taxol (paclitaxol) y similares. Otros agentes quimioterapéuticos incluyen, por ejemplo, un alcaloide de la vinca, un antibiótico de tipo mitomicina, un antibiótico de tipo bleomicina, antifolato, colchicina, demecolina, etopósido, taxano, el antibiótico antraciclina, doxorubicina, daunorrubicina, carminomicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, 4-dimetoxi-daunomicina, 11-desoxidaunorrubicina, 13-desoxidaunorrubicina, adriamicina-14-benzoato, adriamicina-14-octanoato, adriamicina-14-naftalenoacetato, aminascrina, carmustina, ciclofosfamida, citarabina, etopósido, lovastatina, melfalán, topotecán, oxaliplatino, clorambucilo, metotrexato, lomustina, tioguanina, asparaginasa, vinblastina, vindesina, tamoxifeno o mecloretamina. Aunque no desean ser limitantes, los anticuerpos terapéuticos incluyen anticuerpos dirigidos contra la proteína HER2, tales como trastuzumab; anticuerpos dirigidos contra factores de crecimiento o receptores de factores de crecimiento, tales como bevacizumab, que se dirige al factor de crecimiento endotelial vascular, y OSI-774, que se dirige al factor de crecimiento epidérmico; anticuerpos dirigidos a receptores de integrina, tales como Vitaxin (también conocido como MEDI-522), y similares. Las clases de agentes anticancerosos adecuadas para su uso en composiciones y métodos de la presente invención incluyen, pero sin limitación: 1) alcaloides, que incluyen, inhibidores de microtúbulos (por ejemplo, vincristina, vinblastina y vindesina, etc.), estabilizadores de microtúbulos (por ejemplo, Paclitaxel [Taxol] y Docetaxel, Taxotere, etc.) e inhibidores de la función de la cromatina, que incluyen inhibidores de topoisomerasa, tales como, epipodofilotoxinas (por ejemplo, Etopósido [VP-16] y Tenipósido [VM-26], etc.), y agentes que se dirigen a la topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecina e isirintecán [CPT-11], etc.); 2) agentes de unión covalente al ADN [agentes alquilantes], que incluyen mostazas nitrogenadas (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo, ciclofosfamida, ifosfamida, y Busulfan [Mileran], etc.), nitrosoureas (por ejemplo, Carmustina, Lomustina y Semustina, etc.), y otros agentes alquilantes (por ejemplo, Dacarbazina, Hidroximetilmelamina, Tiotepa y Mitocicina, etc.); 3) agentes de unión no covalente al ADN [antibióticos antitumorales], incluyendo inhibidores de ácidos nucleicos (por ejemplo, Dactinomicina [Actinomicina D], etc.), antraciclinas (por ejemplo, Daunorrubicina [Daunomicina y Cerubidina], Doxorubicina [Adriamicina] e Idarrubicina [Idamicina], etc.), antracenodionas (por ejemplo, análogos de antraciclina, tales como, [Mitoxantrona], etc.), bleomicinas (Blenoxano), etc., y plicamicina (mitramicina), etc.; 4) antimetabolitos, incluidos los antifolatos (por ejemplo, Metotrexato, Folex y Mexato, etc.), antimetabolitos de purina (por ejemplo, 6-Mercaptopurina [6-MP, Purinetol], 6-tioguanina [6-TG], azatioprina, aciclovir, Ganciclovir, Clorodesoxiadenosina, 2-Clorodesoxiadenosina [CdA] y 2'-Desoxicoformicina [Pentostatina], etc.), antagonistas de pirimidina (por ejemplo, fluoropirimidinas [por ejemplo, 5-fluorouracilo (Aduvici), 5-fluorodesoxiuridina (FdUrd) (Floxuridina)] etc.), y arabinósidos de citosina (por ejemplo, Cytosar [ara-C] y Fludarabina, etc.); 5) enzimas, que incluyen L-asparaginasa; 6) hormonas, que incluyen, glucocorticoides, tales como, antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, etc.), antiandrógenos no esteroideos (por ejemplo, Flutamida, etc.) e inhibidores de aromatasa (por ejemplo, anastrozol [Arimidex], etc.); 7) compuestos de platino (por ejemplo, cisplatino y carboplatino, etc.); 8) anticuerpos monoclonales conjugados con fármacos anticancerosos, toxinas y/o radionúclidos, etc.; 9) modificadores de la respuesta biológica (por ejemplo, interferones [por ejemplo, IFN- α , etc.] e interleucinas [por ejemplo, IL-2, etc.], etc.); 10) inmunoterapia adoptiva; 11) factores de crecimiento hematopoyético; 12) agentes que inducen la diferenciación de células tumorales (por ejemplo, ácido todo-trans-retinoico, etc.); 13) técnicas de terapia génica; 14) técnicas de terapia antisentido; 15) vacunas tumorales; 16) terapias dirigidas contra metástasis tumorales (por ejemplo, Batimistat, etc.); y 17) inhibidores de la angiogénesis. Por lo tanto, en una realización, el régimen terapéutico es una administración de cisplatino en combinación con paclitaxel.

La divulgación proporciona un método para predecir el efecto de un agente o combinación de agentes. El método incluye determinar la diferencia entre un nivel o estado inicial de la molécula en una muestra y el nivel o estado de la molécula después de la estimulación de una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*, en el que la diferencia en el nivel o estado inicial de la molécula expresado como un valor indica un efecto positivo o negativo del agente. En una realización, el agente interacciona directamente con la molécula en la muestra. En otra realización, el efecto es la activación o inhibición de una ruta celular seleccionada del grupo que consiste en una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica.

La divulgación proporciona un método de selección de agentes de ensayo para determinar un efecto sobre una molécula. Por lo tanto, los efectos de la presencia o ausencia de un agente de ensayo también se pueden determinar detectando un biomarcador *ex vivo*, por ejemplo, una proteína, iones o enzimas modificadas postraduccionalmente. El método incluye poner en contacto una muestra que contiene la molécula o moléculas con el agente de ensayo *ex vivo*, determinar después una diferencia entre un nivel o estado inicial de la molécula en la muestra y el nivel o estado de la molécula después de la estimulación de una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*; en el que una diferencia en el nivel o estado inicial de la molécula antes y después de la puesta en contacto con el agente de ensayo indica un efecto sobre la molécula.

Los agentes de ensayo adecuados incluyen, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: un compuesto químico de molécula pequeña, un agente quimioterapéutico, una hormona, una proteína, un péptido, un peptidomimético, una proteína, un anticuerpo, un ácido nucleico, una molécula de ARNi y una molécula antisentido. En una realización, la administración de un agente de ensayo puede seguirse midiendo un efecto cuantitativo o cualitativo sobre un biomarcador o una biomolécula diana *ex vivo* de la célula dispersada o distribuida.

En otra realización, se puede determinar si el agente de ensayo influye en la expresión de uno o más marcadores, siendo la presencia, la ausencia o el grado relativo de dicha expresión indicativo de la susceptibilidad de las células a un agente farmacéutico seleccionado. Estos marcadores pueden incluir una amplia gama de biomarcadores *ex vivo* tales como ARNm, un microARN, ADNc, una proteína, una fosfoproteína, una modificación postraduccional de una proteína, o una modificación de histonas o del empaquetamiento de ADN. Por ejemplo, el marcador puede ser ARNm o ADNc para un gen de respuesta temprana (por ejemplo, FOS o JUN) asociado con susceptibilidad a un agente farmacéutico. La presencia, ausencia o grado relativo de expresión de combinaciones de marcadores en presencia de un reactivo de ensayo puede indicar la susceptibilidad de las células a un reactivo de ensayo seleccionado, tal como un agente farmacéutico.

Para ciertos métodos analíticos, el agente de ensayo puede ser un agente detectable. El agente detectable puede utilizarse individualmente o como conjugado o conectado de otro modo a otro compuesto (por ejemplo, un agente detectable conjugado con un anticuerpo). Los agentes detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, una enzima, un material fluorescente, un material luminiscente, un material bioluminiscente, un material radiactivo, un metal emisor de positrones utilizando una tomografía de emisión de positrones, o un ion metálico paramagnético no radiactivo.

Una vez que se establece la enfermedad y se inicia un protocolo de tratamiento, los métodos de la invención se pueden repetir regularmente para evaluar si el nivel o intensidad de los síntomas relacionados con la enfermedad en el sujeto comienza a aproximarse a lo que se observa en un sujeto normal. Los resultados obtenidos de los ensayos sucesivos pueden utilizarse para mostrar la eficacia del tratamiento durante un período de tiempo que varía de varios días a meses. Por consiguiente, la invención también se dirige a métodos para controlar el ciclo de una terapia de un sujeto. El método incluye determinar la diferencia entre un nivel o estado inicial de una molécula en una muestra y el nivel o estado de la molécula después de la estimulación de una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*, opcionalmente antes, simultáneamente o después un ciclo de terapia; en el que la diferencia en el nivel o estado inicial de la molécula expresada como un valor indica un tratamiento positivo o negativo. Por lo tanto, un tratamiento positivo indica que el sujeto responde al ciclo de la terapia. Del mismo modo, un tratamiento negativo indica que el sujeto presenta resistencia al ciclo de la terapia.

En una realización, el método puede incluir además la comparación del nivel de las señales y síntomas relacionados con la enfermedad antes y durante la terapia, donde una disminución de las señales y de los síntomas de la enfermedad indica la eficacia de la terapia. Por lo tanto, un experto en la materia podrá reconocer y ajustar el enfoque terapéutico según sea necesario.

Los métodos descritos en este documento se pueden realizar con o sin un cartucho, como se describe en la Publicación de Estados Unidos No. 2009/0162853. Una ventaja de los métodos y dispositivos de este documento es que el agente de ensayo puede añadirse en el centro de atención sanitaria y/o puede venir cargado previamente en los pocillos especificados del cartucho. Esto permite ensayar biomarcadores *ex vivo*, opcionalmente cerca del centro de atención sanitaria, utilizando células vivas. Estos métodos y dispositivos pueden utilizarse con agentes de ensayo específicos para manipular muestras *ex vivo* para facilitar el desarrollo de nuevos biomarcadores predictivos, controlar y determinar la sensibilidad celular a agentes farmacéuticos específicos, y otros usos que apreciará un experto en la técnica.

Por ejemplo, una muestra de un tumor sólido de un paciente puede separarse, distribuirse y después someterse a ensayo frente a un panel de agentes terapéuticos contra el cáncer, actualmente disponibles en el centro de atención sanitaria. Después, las muestras pueden estabilizarse y/o fijarse si fuera necesario y analizarse. Dependiendo de los resultados para cada agente de ensayo, el médico puede determinar rápidamente qué agentes terapéuticos serán más efectivos en el tumor del paciente individual en el centro de atención sanitaria o cerca del mismo. Este medicamento personalizado proporciona numerosos beneficios, en particular, el uso de agentes terapéuticos y regímenes específicos contra el cáncer de una manera rápida y rentable.

Las realizaciones de la invención se dirigen a analizar las células distribuidas (por ejemplo, células cancerosas) administrando al menos un agente para producir un efecto cuantitativo o cualitativo cuantificable sobre un biomarcador o biomolécula diana *ex vivo*. El efecto cuantitativo o cualitativo puede ser la activación o inhibición de una ruta celular. Como ejemplos de rutas celulares se incluyen, pero sin limitación, una ruta metabólica, una ruta de replicación, una ruta de señalización celular, una ruta de señalización oncogénica, una ruta apoptótica y una ruta proangiogénica. Por ejemplo, el efecto cuantitativo o cualitativo puede ser una medida de un efecto agonista o antagonista sobre un receptor acoplado a proteína G o una tirosina quinasa receptora, tal como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las rutas posteriores.

En diversas realizaciones, las células y / o moléculas se analizan utilizando uno o más métodos seleccionados de una matriz, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), análisis multiplex, bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Northern, transferencia Southern, transferencia Western y radioinmunoensayo (RIA). En otras realizaciones, las células y / o moléculas se analizan utilizando cualquier aparato conocido en la técnica para analizar ácidos nucleicos. En otras realizaciones, la diferencia entre un nivel o

estado inicial de una molécula en una muestra de un sujeto y el nivel o estado de la molécula después de la estimulación de una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*, se determina utilizando un ordenador.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la estratificación de pacientes basado en el grado respuesta a un agente terapéutico o régimen terapéutico según la reivindicación 4. El método incluye determinar la diferencia entre un nivel o estado inicial de una proteína en una muestra de un sujeto y el nivel o estado de la proteína después de la estimulación de una parte de la muestra con un modulador *ex vivo*; en el que la diferencia en el nivel o estado inicial de la molécula expresada como un valor, indica una respuesta positiva o negativa a un agente o régimen terapéutico. Por lo tanto, una respuesta positiva indica que el sujeto responde al ciclo de la terapia. Del mismo modo, una respuesta negativa indica que el sujeto presenta resistencia al ciclo de la terapia.

Como se describe en el presente documento, las células procesadas utilizando la presente invención pueden prepararse y estabilizarse de diversas formas para permitir que en ellas se realice una gran variedad de análisis celulares. Por ejemplo, las células pueden prepararse para análisis de ácidos nucleicos, análisis de proteínas, y/o para analizarse utilizando sondas celulares vivas.

Para el análisis de ácidos nucleicos, se puede añadir a las células un reactivo estabilizante tal como RNAlater®, RNA Protect Cell Reagent® (ambos disponibles en Qiagen) o etanol. Opcionalmente, las células estabilizadas pueden someterse a lisis o puede haberse extraído el ácido nucleico de interés de otro modo. El ácido nucleico extraído y purificado puede analizarse después, por ejemplo, utilizando técnicas de PCR.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en este documento, producen moléculas de ácido nucleico para análisis adicionales. Para estas muestras, después de la dispersión y el enriquecimiento opcional, los ácidos nucleicos pueden estabilizarse o extraerse (opcionalmente) para producir moléculas de ácido nucleico de alta calidad y cantidad. Esto puede realizarse, por ejemplo, sometiendo a lisis las células deseadas después de la exposición a un agente de ensayo y después obteniendo ADNc utilizando transcriptasa inversa y cebadores de ADN. Los cebadores de ADN pueden incluir un cebador inespecífico complementario a poli A, por ejemplo, oligo (dT)12-18, o un cebador específico complementario a un transcrito de ARNm de interés. Como apreciará un experto en la materia, las células pueden someterse a lisis utilizando una variedad de métodos, tales como, medios químicos o mecánicos.

Opcionalmente, las células pueden estabilizarse con reactivos para detectar y/o preservar información de los biomarcadores, por ejemplo, utilizando transcriptasa inversa y un cebador de ADN para obtener transcritos de ADNc, preparando ARN, ADN y proteína para análisis moleculares posteriores.

Para el análisis de proteínas o de ácidos nucleicos, pueden utilizarse células enteras o células sometidas a lisis. Las células enteras intactas pueden fijarse y estabilizarse con un polímero, de modo que la muestra se adhiera a la cámara aislada, por ejemplo, a un portaobjetos de vidrio. Después, estas muestras pueden someterse a análisis, por ejemplo, análisis inmunohistoquímico (IHC). Las células sometidas a lisis o, de otra manera, rotas, pueden utilizarse en ensayos tales como transferencia Western y pueden no requerir estabilización o fijación.

La preparación de portaobjetos para su inspección morfológica por parte de patólogo y el análisis de proteínas mediante IHC, pueden ser un resultado de los métodos descritos en este documento. Por consiguiente, las células también pueden prepararse, opcionalmente, utilizando polímeros, en portaobjetos de vidrio para análisis de morfología y/o inmunohistoquímica.

El análisis con sondas celulares vivas puede implicar la adición de una sonda molecular (tal como MitoTracker®) en cualquier momento en el método de procesamiento de las células en el que las células están vivas. Esta adición de la sonda de células vivas debe hacerse antes de la fijación o, de otro modo, dejando que las células mueran. Por ejemplo, dicha sonda puede añadirse antes o después de la estabilización celular pero antes de la fijación celular.

En algunas realizaciones, las células pueden estabilizarse y fijarse mediante cualquier medio adecuado que permita el análisis molecular posterior y la detección de marcadores. Generalmente, los fijadores de reticulación, tales como formalina, no son los preferidos, pero pueden estar presentes en pequeñas cantidades que no interferirán con el análisis posterior. Cuando el biomarcador es la expresión de un gen o genes particulares, en una realización las células se someten a lisis y se exponen a transcriptasa inversa y a cebadores adecuados, para generar transcritos de ADNc de transcritos de ARNm en las células. Esto facilita el análisis posterior, ya que el ADNc está menos sujeto a la degradación que el ARNm.

En algunas realizaciones, se procesan 1×10^4 células, o más, para estabilizar cualquiera o todos de los siguientes: ARN, ADN, proteína y/o fosfoproteínas.

En algunas realizaciones, las células pueden fijarse después del procesamiento. Se puede utilizar cualquier medio de fijación adecuado, por ejemplo, técnicas de secado al aire, la adición un compuesto, tal como alcohol, por ejemplo, un fijador que comprenda un alcohol inferior, por ejemplo, metanol o etanol, la adición de formalina, la adición de un inhibidor de RNasa, la adición de agarosa, la adición de polietilenglicol, la adición de poli-1-lisina o la

adición de uno o más quelantes o antioxidantes. En algunas realizaciones, el fijador incluye agarosa, polietilenglicol, octilfenoxipolietilenglicol, poli-1-lisina, alcohol reactivo y agua.

En otro aspecto, los métodos de la presente invención incluyen un método para preparar células de tejido sólido de un sujeto, por ejemplo, células tumorales sólidas de un animal o de un ser humano que tiene un tumor sólido, por ejemplo, para la determinación de la sensibilidad de las células a un agente farmacéutico específico seleccionado. Un método de ejemplo puede incluir las etapas de: (a) obtener tejido sólido que comprenda células deseadas del sujeto; (b) dispersar (por ejemplo, utilizando fuerzas de cizalla) el tejido, en células individuales vivas y/o agregados de no más de 100 células vivas, por ejemplo, de 10 a 100 células; (c) enriquecer la muestra, por ejemplo, eliminando materiales contaminantes de las células vivas; (d) distribuir las células vivas en alícuotas de ensayo en cámaras aisladas; (e) exponer las células vivas a uno o más reactivos de ensayo; y (f) tratar las células con un agente fijador y/o estabilizador (por ejemplo, un agente que estabilice ARN, ADN, proteínas y/o fosfoproteínas) para fijar las células y/o los marcadores tumorales para un análisis posterior; en el que la fijación de las células tumorales y/o del marcador se lleva a cabo, de manera automática o manual, a las cuatro horas de la extracción del tejido del sujeto.

Otra realización de la invención proporciona un método de ensayo de células en el que las células de tumores sólidos se extraen de un mamífero (por ejemplo, de un paciente humano), y aunque la mayoría de las células, por ejemplo, al menos el 65% de las células, por ejemplo, al menos el 75% de las células, son viables y no se han multiplicado fuera del cuerpo, se exponen todas o una parte de las células *ex vivo* a uno o más reactivos de ensayo, y las células se estabilizan, opcionalmente, con un fijador (por ejemplo, un polímero) que puede preservar la información de biomarcadores incluyendo ADN celular, ARN, proteínas y/o fosfoproteínas. Estos biomarcadores pueden someterse a ensayo utilizando análisis moleculares conocidos por un experto en la materia o utilizando los nuevos ensayos de biomarcadores *ex vivo* descritos en este documento.

Adicionalmente, para ilustrar adicionalmente las ventajas y características de la presente invención, se proporcionan los siguientes ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la misma. Si bien son típicos de los que podrían utilizarse, pueden utilizarse alternativamente otros procedimientos, metodologías o técnicas conocidas por los expertos en la materia.

EJEMPLO 1

Perfiles de señalización funcionales de matriz de fosfoproteínas

La figura 1 es un gráfico de barras que resume los datos procedentes de una matriz de fosfoproteínas que contiene 29 fosfoproteínas diferentes. Los datos proceden de 3 líneas celulares de cáncer de mama que se han tratado con EGF. Las barras representan la regulación al alza de la fosfoproteína en relación con el estado inicial sin estimulación de EGF. Hay que tener en cuenta que estas líneas celulares muestran conjuntos muy diferentes de fosfoproteínas reguladas al alza después de la estimulación con EGF, dando información sobre las redes de transducción de señales de estas células.

Al utilizar datos brutos similares a los proporcionados en este documento, se utilizará un algoritmo para crear un "perfil" para cada tumor. Por ejemplo, al nivel de cada fosfoproteína individual se le asignará una "puntuación" entre 0, baja, media y alta, basándose en los valores de corte previamente determinados. Después, las puntuaciones de cada proteína analizada dentro de un tumor, se integrarán en un grupo denominado perfil de señalización funcional. Cada perfil proporcionará información sobre el estado funcional de la célula tumoral que después puede utilizarse para predecir la sensibilidad/resistencia del tumor al fármaco específico. En las figuras 2A y 2B se muestra un ejemplo de dichos perfiles de señalización funcionales para un conjunto de cinco líneas celulares de cáncer de mama.

EJEMPLO 2

La estratificación funcional de células de carcinoma de mama permite realizar estrategias terapéuticas predictivas

La mayoría de las terapias dirigidas aún carecen de biomarcadores predictivos efectivos. Una de las principales limitaciones de las clases de biomarcadores existentes es la falta de información funcional sobre las redes de transducción de señales dirigidas por fármacos dirigidos molecularmente. La presente invención proporciona un ensayo funcional basado en biomarcadores *ex vivo* producidos por células tumorales vivas. El perfil es suscitado por estimulación a corto plazo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en presencia o en ausencia de un inhibidor de MEK. Los cambios resultantes en los niveles de fosfoproteína de transducción de señal se utilizan para crear perfiles de señalización funcionales que estratifican líneas de células tumorales en grupos funcionales. Este perfil de señalización funcional es posible a través de una plataforma automatizada que está adaptada al procesamiento de biopsias tumorales.

Líneas celulares de cáncer de mama (BT-474, MDA-MD-231, SKBR3, HCC-1937, BT-20, T47D, MCF-7, BT-549) se propagan y extraen de la placa mediante raspado suave para simular una muestra de biopsia AAF. Después de la

extracción, las células se colocan en la plataforma SnapPath™ (BioMarker Strategies, LLC) de procesamiento de células tumorales vivas, para producir biomarcadores *ex vivo*. La plataforma SnapPath™ dispersa la muestra, enriquece las células tumorales, las divide en alícuotas en pocillos de ensayo y aplica estimulación *ex vivo* mediante EGF (200 ng/ml) en presencia o en ausencia del inhibidor de MEK, U0126 (1 µM). Los lisados celulares se analizan después utilizando la plataforma BioPlex para las siguientes fosfoproteínas: p-Erk 1/2, p-AKT, p-EGFR, p-Stat3 (BioRad). Para cada línea celular se generan perfiles funcionales basándose en los niveles de las fosfoproteínas.

Los perfiles de señalización funcionales de líneas celulares de cáncer de mama estimuladas con EGF en presencia de U0126 revelaron distintos grupos funcionales que permitieron la estratificación. Se identificaron dos grupos funcionales basándose en los niveles de fosforilación de pAKT: un grupo mostró niveles variables, aunque bajos, de inhibición de p-AKT, mientras que otro grupo mostró regulación al alza imprevisible de p-AKT. Este segundo grupo puede ser resistente a la inhibición de MEK, pero sensible a la inhibición combinada de MEK/AKT. Se identificaron otros dos grupos funcionales basándose en los niveles de fosforilación de EGF: un grupo mostró inhibición variable, pero baja, de p-EGFR, mientras que el otro grupo mostró regulación al alza imprevisible de p-EGFR. Este segundo grupo puede ser resistente a la inhibición de MEK, pero sensible a la inhibición combinada de MEK/EGFR.

Los perfiles de señalización funcionales de cánceres humanos revelan detalles exclusivos de redes de transducción de señales que permiten la estratificación de tumores no disponibles a través de biomarcadores tradicionales. Estos perfiles pueden correlacionarse con sensibilidad o resistencia a un fármaco específico y pueden producir diagnósticos complementarios satisfactorios, incluidas las terapias de combinación de agentes específicos. Dichos perfiles funcionales se pueden obtener reproduciblemente a partir de pequeñas cantidades de células tumorales en una plataforma automatizada, lo que sugiere que este enfoque de ensayos predictivos es posible para muestras de biopsias tumorales humanas.

EJEMPLO 3

Estratificación de cánceres de mama basándose en los perfiles de señalización funcionales de fosfoproteínas obtenidos de células tumorales vivas

Las redes de transducción de señales anómalas son dianas frecuentes de agentes dirigidos molecularmente (MTA) existentes y emergentes. Desafortunadamente, la mayoría de los biomarcadores predictivos para guiar la selección terapéutica se basan en la evaluación indirecta de la transducción de señales a través de mutaciones de ADN o perfiles transcripcionales en lugar de en la evaluación dinámica de las propias proteínas de transducción de señales. La clasificación del cáncer de mama basada en perfiles de señalización funcionales obtenidos de un conjunto de fosfoproteínas de señalización inducidas por la estimulación del factor de crecimiento de células de cáncer de mama vivas es probable que proporcione un sistema más preciso para la selección de MTA que los métodos indirectos que utilizan tejido fijado o congelado.

Este ejemplo proporciona una demostración para la estratificación de sistemas de modelos de cáncer de mama múltiples basados en perfiles de señalización funcionales obtenidos de células tumorales vivas en respuesta a estímulos *ex vivo*. Líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7, HCC-1937, MDA-MB-231, BT474 y SKBR3) se exponen a vehículo (control) o se estimulan con factor de crecimiento epidérmico (EGF) 200 ng/ml durante 5 minutos y después se someten a lisis y se extraen las proteínas. En la figura 3 se muestra la ruta de transducción de señal en la que interviene el EGF. Los niveles de intensidad de fluorescencia media (IFM) de seis fosfoproteínas (pEGFR, pErk, pAKT, pP70S6K, pGSK3β y pSTAT3) se determinaron en sextuplete utilizando un inmunoensayo con perlas multiplexado (BioPlex, BioRad) y para cada una de ellas se calculó una puntuación de modulación (PM), definida como el log₂ (IFM estimulada/IFM control). En las figuras 4 y 5 se muestran los métodos de adquisición y procesamiento de muestras. Las puntuaciones se clasifican por percentiles en relación con la mediana (0,66) y el rango intercuartílico (RIC) (1,54). Las que responden moderadamente se clasifican como aquellas con una PM entre el percentil 75 (2,20) y el percentil 75 más el RIC (3,74). Las que responden intensamente son aquellas con una PM > 3,74. Las que responden escasamente son aquellas con una PM que está entre el RIC y el percentil 75 (1,54-2,20), mientras que las que no responden se clasifican como aquellas con una PM <1,54.

En la figura 6 se muestra la estratificación funcional de las líneas celulares de cáncer de mama ensayadas y en la figura 7 se muestra la agrupación jerárquica de la línea celular basándose en la estratificación funcional. La estimulación con EGF da como resultado altos niveles de fosforilación de EGFR en todas las líneas celulares, excepto en BT474, que responde moderadamente (2,57). La PM para pErk es alta en la línea celular MCF-7 (3,92), moderada en HCC-1937 (2,89) y cero en las otras líneas celulares ensayadas. Se observa fosforilación moderada de STAT-3 solo en la línea celular MCF-7 (2,34) mientras que se observa una PM de pAKT baja solo en SKBR3 (1,78). Los demás marcadores de las cinco líneas celulares ensayadas son no respondedores (<1,54), dando pGSK3β y pP70S6K una PM <1,0 en las cinco líneas celulares. Curiosamente, el orden de clasificación de PM relativo de las seis proteínas difirió en cada línea celular, lo que sugiere una oportunidad adicional para la estratificación.

En la figura 8 se muestran las correlaciones entre líneas celulares monocapa y líneas celulares procesadas con SanpPath™, y en la Tabla 1 se muestra el agrupamiento de las líneas celulares procesadas. Este ejemplo

demuestra que SnapPath™ permite la estratificación funcional en líneas celulares y en xenoinjertos. En las figuras 9 (HCC-1937) y 10 (MDA-MB-231) se muestran correlaciones entre una línea celular procesada con SnapPath™ y un xenoinjerto.

Tabla 1. Agrupamiento de línea celular procesada con SnapPath™								
	BT-20	BT-474	BT-549	HCC-1937	MCF-7	MDA-MB-231	SKBR3	T-47D
BT-20	-	0,33	0,93	0,90	0,18	0,96	0,15	0,62
BT-474		-	0,05	0,69	0,99	0,06	0,67	0,91
BT-549			-	0,78	-0,31	0,98	0,31	0,49
HCC-1937				-	0,22	0,78	0,55	0,90
MCF-7					-	0,24	0,19	0,50
MDA-MB-231						-	0,17	0,46
SKBR3							-	0,77
T-47D								-

La figura 11 muestra la relación entre la estratificación funcional y la posible correlación de fármacos, donde se ilustran la sensibilidad a los fármacos y el factor de cambio inducido después de las estimulaciones. La figura 12 muestra la relación entre la estratificación funcional y las posibles opciones terapéuticas. Diferentes líneas celulares de cáncer de mama muestran perfiles de señalización funcional de fosfoproteínas exclusivos, proporcionando así un mecanismo para estratificar tumores basándose en la activación de la ruta de transducción de señal individual.

La figura 13 muestra una ilustración donde la posible sensibilidad al fármaco se asocia a perfiles de señalización funcionales de TNBC. La fila superior incluye pAKT, pErk y pEGFR. La fila inferior incluye pGSK, pSTAT3 y p70S6k. La figura 14 muestra una ilustración donde la estratificación *ex vivo* y el análisis de circuitería funcional celular es posible a través de inhibición de fármacos en el sistema SnapPath™. Este análisis también incluye pAKT, pErk, pGSK, p70S6k, pSTAT3 y pEGFR.

El sistema SnapPath™ es una plataforma automatizada capaz de producir perfiles de señalización funcionales de líneas celulares y tumores de xenoinjerto. Los perfiles de señalización funcionales obtenidos a partir del sistema SnapPath™ se pueden correlacionar con datos de sensibilidad y resistencia a fármacos lo que proporciona el establecimiento de una plataforma de diagnóstico predictivo.

También se desvela un método para evaluar una función fisiológica o toxicidad de un agente, un compuesto, un medicamento, un veneno o similar, utilizando diversas células obtenidas mediante los métodos descritos en este documento.

EJEMPLO 4

Perfiles de señalización funcionales de melanoma

Durante varios años se ha reconocido que el melanoma se desarrolla a través de interacciones complejas y heterogéneas de varias rutas moleculares que controlan la proliferación, la supervivencia y la apoptosis celular.

En particular, la ruta RAS-RAF-MEK -ERK parece desempeñar una función importante. Aproximadamente el 20% de los melanomas contienen una mutación en NRAS y otro 66% contiene una mutación en BRAF. Además de sus funciones en la patogenia del melanoma, estos defectos moleculares han demostrado ser dianas farmacológicas útiles. Por ejemplo, el inhibidor de RAF, PLX-4032, ha mostrado una tasa de respuesta notable en ensayos clínicos en fase I y II. Desafortunadamente, tanto la resistencia primaria como la adquirida surgen invariablemente en pacientes tratados con dichos inhibidores de RAF.

Sorprendentemente, esta resistencia no se ha atribuido al mecanismo conocido de mutaciones secundarias en el dominio de unión al fármaco de la proteína específica. En cambio, los pacientes parecen reactivar la ruta de MAPK o utilizar un mecanismo de señalización de desvío alternativo. Dado que el simple análisis de ADN para mutaciones no puede resolver estos mecanismos de resistencia, un ensayo funcional es un enfoque ideal para identificar la resistencia y predecir la terapia específica apropiada (Soon, Soon et al. The Ochsner Journal 2010; 10 (2): 93-98; McMahon, M: *Parsing out the complexity of RAF inhibitor resistance*. *Pigment Cell & Melanoma Research*. Artículo publicado por primera vez en línea: 12 de enero de 2011).

La Tabla 2 resume el genotipo y el fenotipo de líneas celulares de melanoma utilizadas para obtener perfiles de señalización funcionales, que representan el espectro de muestras reales de melanoma humano.

Como se muestra en las figuras 15-17 y 19-36, los perfiles de señalización funcionales pueden distinguir y estratificar muestras de melanoma basándose en diferencias en su circuitería de transducción de señales. Dichos perfiles pueden generarse comparando niveles iniciales de diversas proteínas (que incluyen pErk, pAKT, pP70S6k, pGSK3β, EGF y STAT3) con niveles tras la exposición de células a diversos agentes (incluidos EGF, TPA, otros factores de crecimiento). Además, la alteración de las redes de transducción de señales exponiendo las células de

melanoma a diversos agentes (tales como inhibidores de MEK, inhibidores de BRAF, etc.) puede revelar información funcional adicional, que incluye la aclaración del mecanismo de resistencia a fármacos y de los mecanismos de derivación de oncogenes. Tomados en conjunto, dichos perfiles de señalización funcionales pueden formar el establecimiento de ensayos de pronóstico, predictivos, farmacodinámicos o de control.

5

Tabla 2. Genotipos y fenotipos de células de melanoma para resistencia a fármacos		
Células de melanoma	Genotipo	Fenotipo PLX-4032
SK-MEL-31	BRAF-ts, RAS-ts	Resistente
SK-MEL-28	BRAF mut (V600E)	Sensible
SK-MEL-2	NRAS mut	Desconocido
RPML-7951	Amplificación de COT BRAF mut (V600E)	Resistente

Las figuras 15-17 y 19-36 también muestran varios ejemplos específicos de características del perfil de señalización funcional que distinguen muestras de melanoma y se correlacionan con la sensibilidad o resistencia al fármaco. Por ejemplo, la figura 15 muestra que las líneas celulares SK-MEL-31 y RPMI-7951 presentan la inducción más alta de pEGFR tras la estimulación con EGF. Sorprendentemente, estas dos líneas celulares también presentan resistencia al inhibidor de BRAF, PLX-4032. Los niveles iniciales de varias proteínas también pueden distinguir melanomas. Por ejemplo, las líneas celulares SK-MEL-31, SK-MEL-28, SK-MEL-2 y RPMI-7951 presentan niveles iniciales diferentes de pERK (IFM promedio de 1816, 3880, 1948 y 776, respectivamente) y pAKT. Adicionalmente, la figura 16 muestra que la inhibición de MEK por U0126 también demuestra una circuitería funcional única de cada línea celular, incluida la mejora imprevista de rutas colaterales, tales como las marcadas por pERK y pEGFR. La figura 17 muestra diferenciación de la línea celular RPMI-7951, resistente a PLX-4032, a través de la inducción de pErk después de estimulación con TPA, activador tisular del plasminógeno. Adicionalmente, las figuras 19-34 demuestran la capacidad de distinguir líneas celulares de melanoma basándose en la modulación con TPA, EGF, PDGF β , o en la inhibición con PLX-4702 o U0126.

10

15

20

Las figuras 19-36 muestran la capacidad de distinguir líneas celulares de melanoma basándose en la modulación con TPA EGF, PDGF β , o en la inhibición con PLX-4702 o U0126. Por ejemplo, las figuras 19 y 20 muestran perfiles de señalización funcionales producidos de cuatro líneas celulares de melanoma diferentes moduladas con TPA y EGF. Como se observa en la Figura 20, RPMI-7951 y SK-MEL-31 tienen niveles diferenciadores de pEGFR después de estimulación con pEGFR.

25

Las figuras 21 y 22 muestran el impacto de la inhibición de MEK por U0126 en ausencia (Figura 21) y en presencia (Figura 22) de modulación de EGF en cuatro líneas celulares de melanoma. En ausencia de estimulación de EGF e inhibición de MEK en células SK-MEL-28, pErk se inhibe mientras se activa EGF. En células SK-MEL-31, pErk también se inhibe a un nivel comparable, aunque pAkt se regula al alza después de la inhibición. En la figura 22 también se muestran tendencias comparables.

30

Las figuras 23 y 24 muestran el impacto de la estimulación de PDGF β en líneas celulares de melanoma así como la inhibición de MEK de la estimulación de PDGF β . La estimulación de PDGF β activó pPDGF en líneas celulares RPMI-7951 de forma única en comparación con otras líneas celulares de melanoma. La inhibición de MEK reduce pErk en aproximadamente un 50% en las líneas celulares SK-MEL-21, SK-MEL-28 y RPMI-7951. pErk no se ve afectada por la inhibición de MEK en líneas celulares SK-MEL-2.

35

Las figuras 33 y 34 muestran el impacto de la estimulación de EGF en líneas celulares SK-MEL-28 en presencia del inhibidor de BRAF, PLX-4702 y del inhibidor de MEK, U0126. La inhibición de PLX más la estimulación de EGF redujo la expresión de pERK aunque no tan significativamente como la inhibición de MEK. pMEK también se incrementó en presencia del inhibidor de MEK y EGF.

40

La figura 35 muestra el impacto de la estimulación de EGF y de la inhibición de PLX-4072 o MEK en células RPMI-7951. EGF aumenta drásticamente seguido de toda la modulación de EGF mientras que pErk disminuye después de la inhibición de MEK.

45

La figura 36 muestra la activación de PDGFR β de células RPMI-7951 en ausencia o en presencia de inhibidor de MEK, U0126, o inhibidor de BRAF, PLX-4702. pMEK se regula a la baja en presencia de PLX-4702, mientras que la inhibición de MEK parece ser menos efectiva.

50

EJEMPLO 5

Perfiles de señalización funcionales de células de cáncer de páncreas

55

Los tumores neuroendocrinos pancreáticos (PancNET) son el segundo tumor más común del páncreas, aunque lo más probable es que representen un grupo heterogéneo de tumores relacionados. El potencial maligno de los tumores neuroendocrinos pancreáticos PancNET, varía en gran medida y no puede predecirse basándose en análisis microscópicos o en ensayos inmunohistoquímicos estándar, tales como los de las tasas de proliferación. Los

perfiles de señalización funcionales ofrecen la oportunidad de identificar tumores con peor pronóstico, así como la posibilidad de identificar características moleculares que permitan la predicción de una terapia específica apropiada. Como se muestra en la figura 18, los perfiles de señalización funcionales pueden distinguir y estratificar muestras de tumor pancreático basándose en las diferencias en su circuitería de transducción de señales. Dichos perfiles pueden generarse comparando niveles iniciales de diversas proteínas (incluyendo pErk, pAKT, pP70S6k, pGSK3 β , pEGFR y pSTAT3) con niveles tras la exposición de las células a diversos agentes (incluyendo EGF, TPA, otros factores de crecimiento, etc.). Además, la alteración de las redes de transducción de señales exponiendo las células de melanoma a diversos agentes (tales como inhibidores de MEK, inhibidores de mTOR, etc.) puede revelar información funcional adicional, que incluye la aclaración de mecanismos de resistencia a fármacos y mecanismos de derivación de oncogenes. Tomados en conjunto, dichos perfiles de señalización funcionales pueden formar el establecimiento de ensayos de pronóstico, predictivos, farmacodinámicos o de control.

La figura 18 también muestra varias características del perfil de señalización funcional que distinguen muestras de tumores pancreáticos y se correlacionan con sensibilidad o resistencia al fármaco. Estos estudios utilizaron muestras reales de tumores humanos de individuos con tumores neuroendocrinos pancreáticos o adenocarcinoma pancreático. Por ejemplo, la figura 18 muestra que los cuatro PancNET pueden distinguirse por sus perfiles funcionales según lo determinado por la inducción de pERK y pGSK después de estimulación con TPA. Sorprendentemente, la muestra con el perfil funcional más distintivo (10189; inducción 10x de pERK) fue el único tumor que fue metastásico. Esto sugiere que dicho perfil funcional puede proporcionar información pronóstica sobre los tumores pancreáticos. Los niveles iniciales de varias proteínas también pueden distinguir tumores pancreáticos. Los perfiles funcionales basados en la alteración por agentes, tales como fármacos, incluidos los inhibidores de mTOR, proporcionan información adicional, algunos de los cuales pueden formar el establecimiento de ensayos predictivos.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a los ejemplos anteriores, se entenderá que dentro del alcance de la misma quedan incluidas sus modificaciones y variaciones. Por consiguiente, la invención solo está limitada por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad caracterizada por un tumor sólido, que comprende:

determinar la diferencia entre un nivel o estado basal de una clase de proteínas en una muestra de células y el nivel o estado de las proteínas después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo* dentro de un cartucho en un sistema automatizado para producir perfiles de señalización funcionales y fijar las células, en el que la diferencia se expresa como un valor utilizado para crear perfiles de señalización funcionales que estratifican las muestras en grupos funcionales mediante un ordenador, que indica la presencia, la ausencia o el riesgo de tener una enfermedad o que indica el pronóstico, y en el que la proteína se modifica por una modificación postraducciona que es una fosforilación.

2. El método de la reivindicación 1, en el que

i) la muestra se selecciona del grupo que consiste en tejido, una línea celular, un xenoinjerto, un tumor y combinaciones de los mismos, la muestra tumoral es de un tumor sólido, adicionalmente en el que la muestra tumoral se obtiene por biopsia aspirativa con aguja fina, con aguja gruesa, de células tumorales circulantes o de una muestra de tejido extirpado quirúrgicamente,

ii) el tumor sólido es un cáncer, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de esófago, de estómago, de pulmón, de próstata, cancer uterino, mamario, de piel, endocrino, urinario, de páncreas, de ovario, de cuello uterino, de cabeza y cuello, de hígado, de hueso, del tracto biliar, de intestino delgado, hematopoyético, vaginal, testicular, anal, de riñón, de cerebro, ocular, linfoma, de tejido blando, melanoma y metástasis de los mismos,

iii) el modulador se selecciona de un modulador físico, biológico o químico,

iv) que adicionalmente comprende exponer la muestra a un agente terapéutico o a una combinación de los mismos, y/o

v) en el que la proteína se analiza utilizando un método seleccionado del grupo que consiste en una matriz, un ensayo ELISA, análisis bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Western y RIA.

3. Un método para controlar una enfermedad o el ciclo de terapia de un sujeto que comprende:

determinar, utilizando un ordenador, la diferencia entre un nivel o estado basal de una clase de proteínas en una muestra de células y el nivel o estado de las proteínas después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo* dentro de un cartucho en un sistema automatizado para producir perfiles de señalización funcionales antes, simultáneamente o después de un ciclo de terapia; en el que la diferencia en el nivel o estado basal de las proteínas que se expresa en el ordenador como un valor utilizado para crear perfiles de señalización funcionales que estratifica las muestras en grupos funcionales indica un tratamiento positivo o negativo, en el que un tratamiento positivo indica que el sujeto responde al ciclo de terapia o un tratamiento negativo indica que el sujeto tiene resistencia al ciclo de terapia, en el que la proteína es una proteína modificada por una modificación postraducciona que es una fosforilación, y en el que la enfermedad es un tumor sólido.

4. Un método para la estratificación de pacientes basado en la capacidad de respuesta a un agente terapéutico o régimen terapéutico que comprende:

determinar, utilizando un ordenador, la diferencia entre un nivel o estado basal de una clase de proteínas en una muestra de células de un sujeto y el nivel o estado de las proteínas después de poner en contacto una parte de la muestra con un modulador *ex vivo* dentro de un cartucho en un sistema automatizado para producir una señalización funcional; en el que la diferencia en el nivel o estado basal de las proteínas que se expresa en el ordenador como un valor utilizado para crear perfiles de señalización funcionales que estratifica las muestras en grupos funcionales indica una respuesta positiva o negativa a un agente o régimen terapéutico, en el que una respuesta positiva indica que el sujeto responde al agente o al régimen terapéutico o una respuesta negativa indica que el sujeto tiene resistencia al agente o al régimen terapéutico, en el que la proteína es una proteína modificada por una modificación postraducciona que es una fosforilación, en el que el agente o régimen terapéutico es para un sujeto cuyo tumor sólido se está tratando.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el modulador es un modulador del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR).

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, en el que la proteína se analiza utilizando un método seleccionado de una matriz, un ensayo ELISA, análisis bioplex, luminex, espectrometría de masas, citometría de flujo, transferencia Western y RIA.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el modulador es un factor de crecimiento o activador tisular del plasminógeno (TPA).

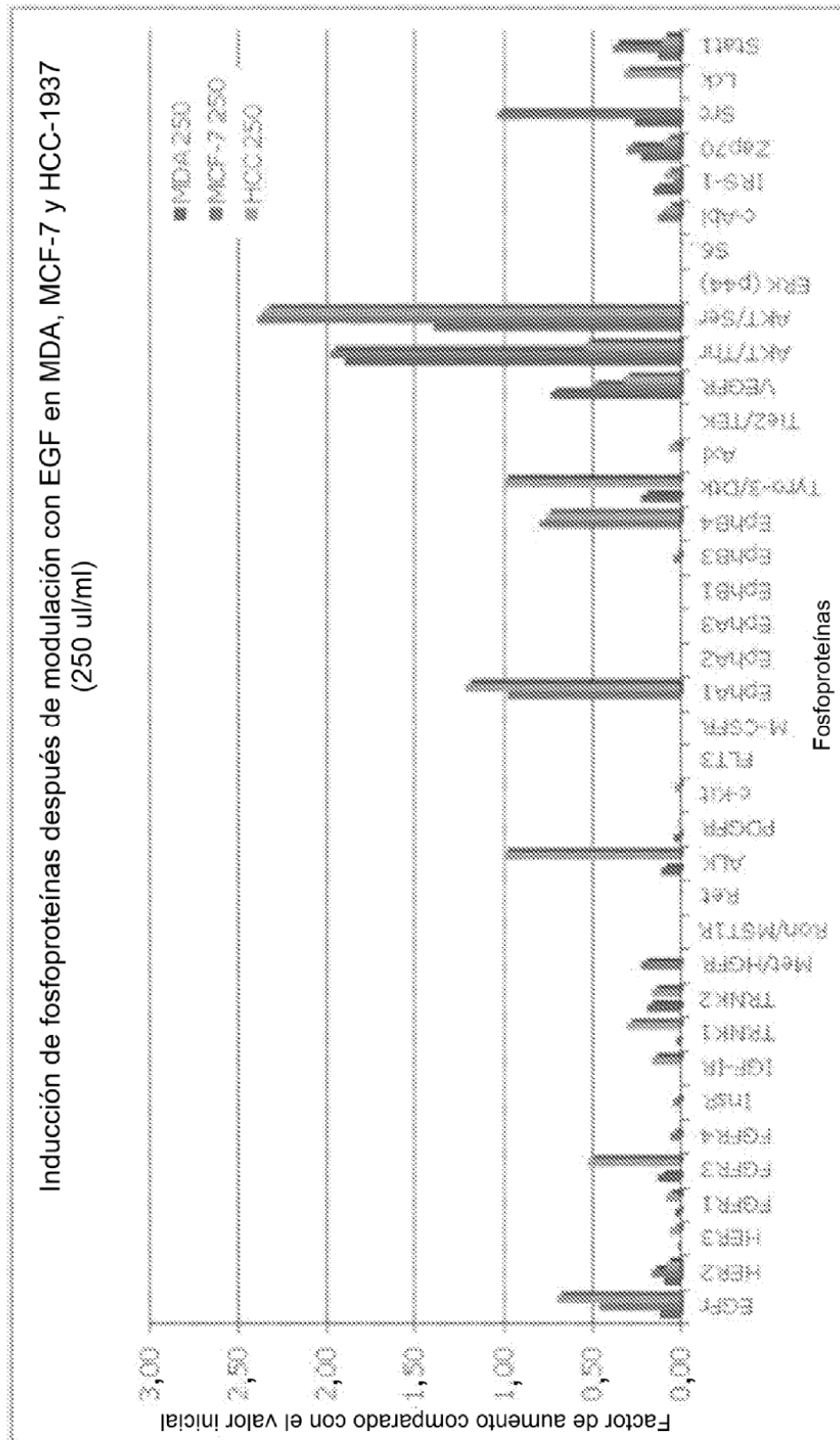


Fig. 1

Valor inicial

	MDA	MCF-7	HCC	SKBR-3	BT-474
EGFR					
HER2					
HER3					
AKT-Ser					
AKT-Thr					
ERK					
Src					
Stat1					
Stat3					
Trk					
Ret					
Lck					
Met					
Ron					
	Respuesta alta				
	Respuesta media				
	Respuesta baja				
	Sin respuesta				

Fig. 2A

Estimulado con EGF

	MDA	MCF-7	HCC	SKBR-3	BT-474
EGFR					
HER2					
HER3					
AKT-Ser					
AKT-Thr					
ERK					
Src					
Stat1					
Stat3					
Trk					
Ret					
Lck					
Met					
Ron					
	R. alta = 1+ Factor de inducción				
	R. media = 0,5 + 1,0 Factor de inducción				
	R. baja = 0,2 - 0,49 Factor de inducción				
	Sin respuesta = 0 - 0,19				

Fig. 2B

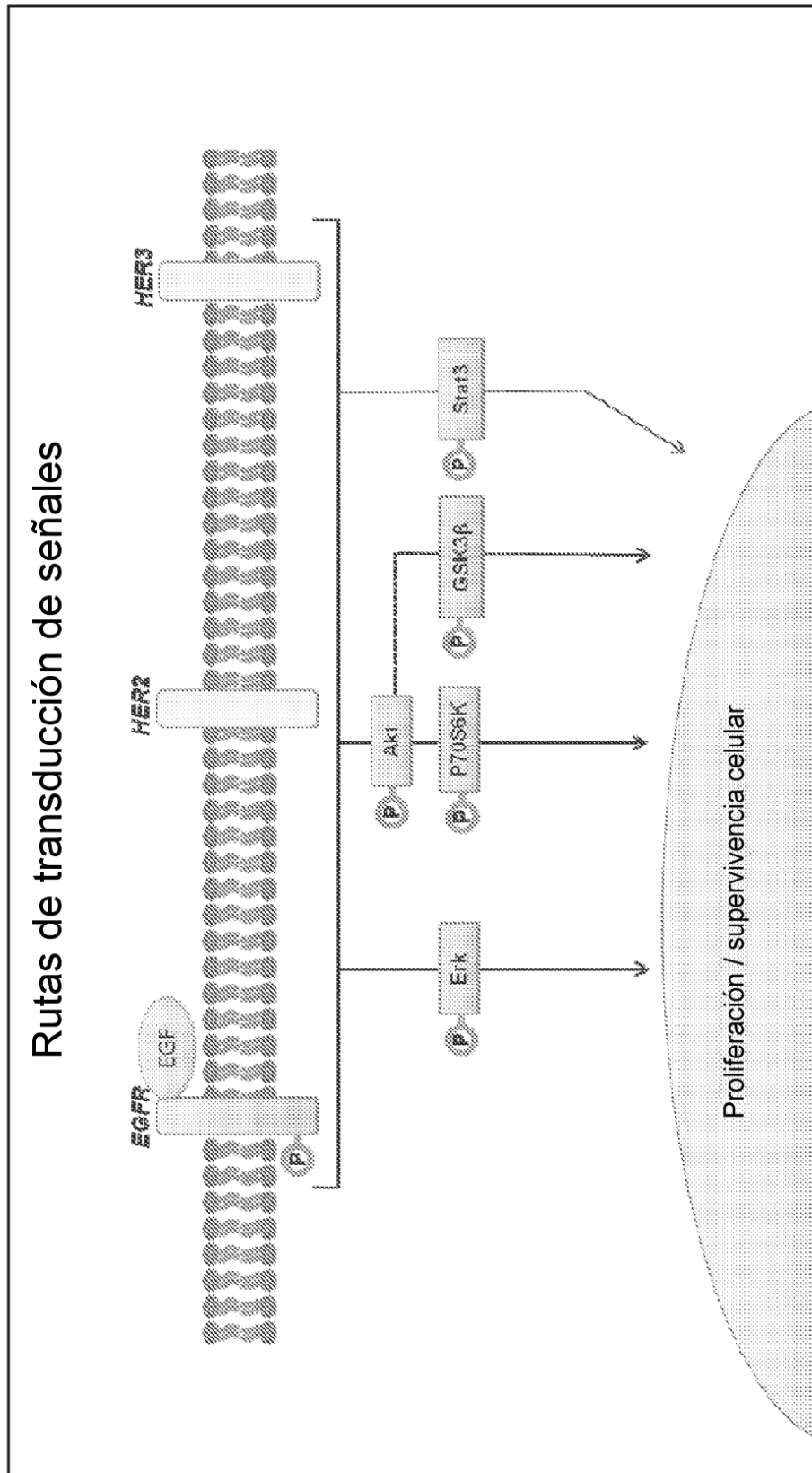


Fig. 3

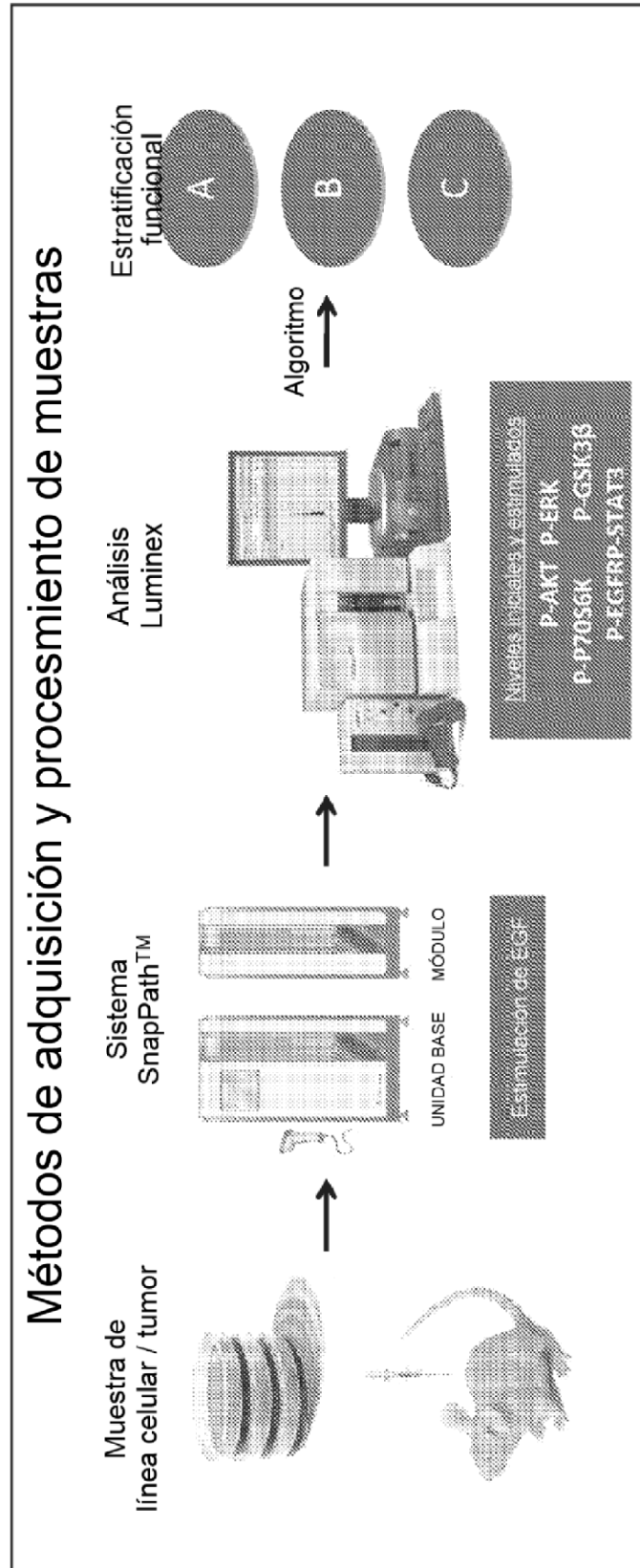


Fig. 4

Sistema y procesamiento con SnapPath™

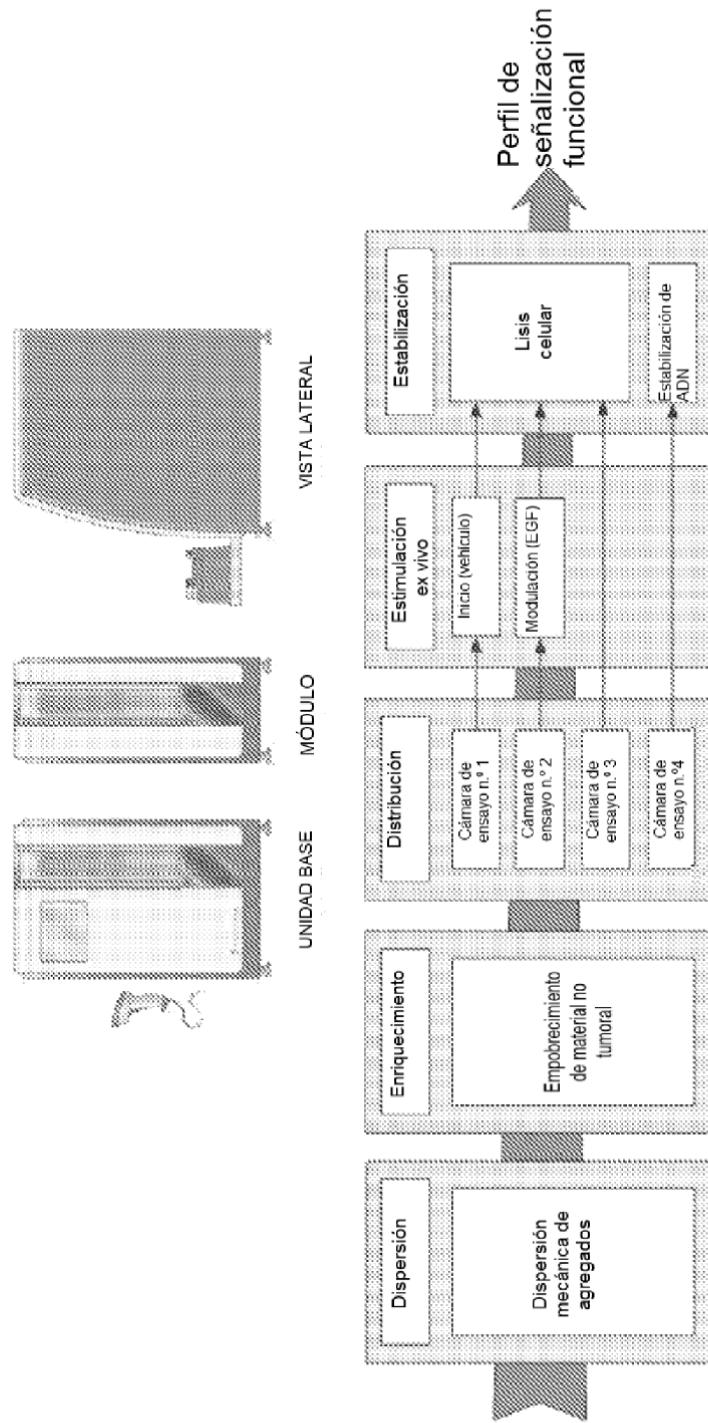


Fig. 5

Perfil funcional de líneas celulares monocapa

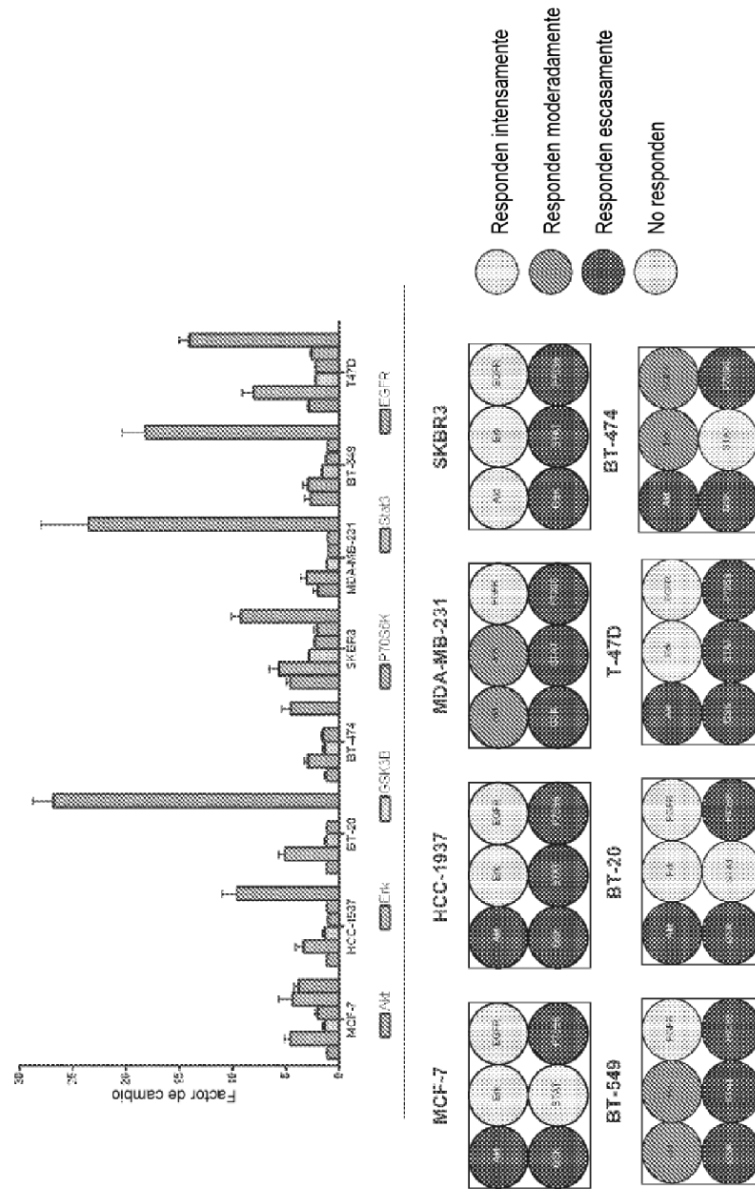


Fig. 6

Agrupacion jerárquica de líneas celulares

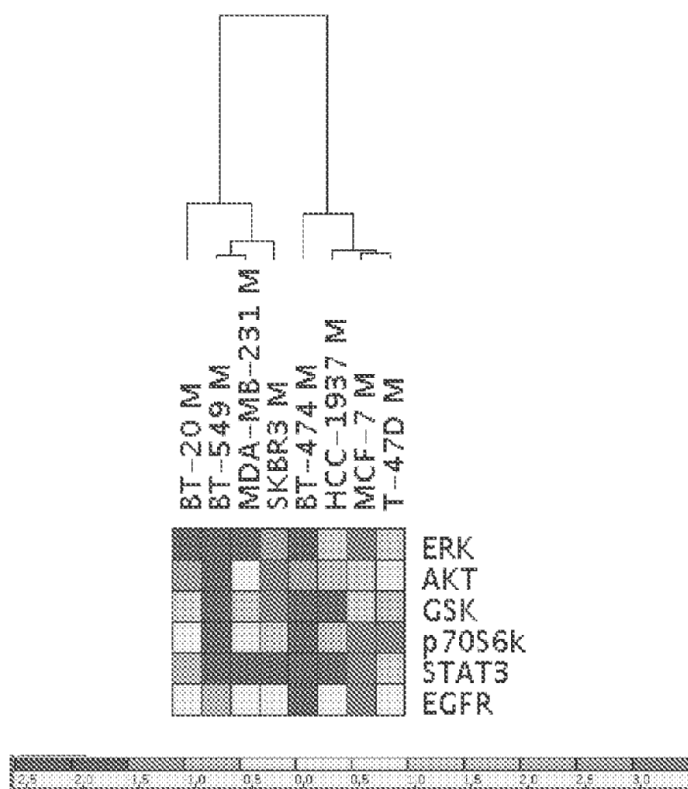


Fig. 7

Correlaciones entre líneas celulares monocapa y líneas celulares procesadas con SnapPath™

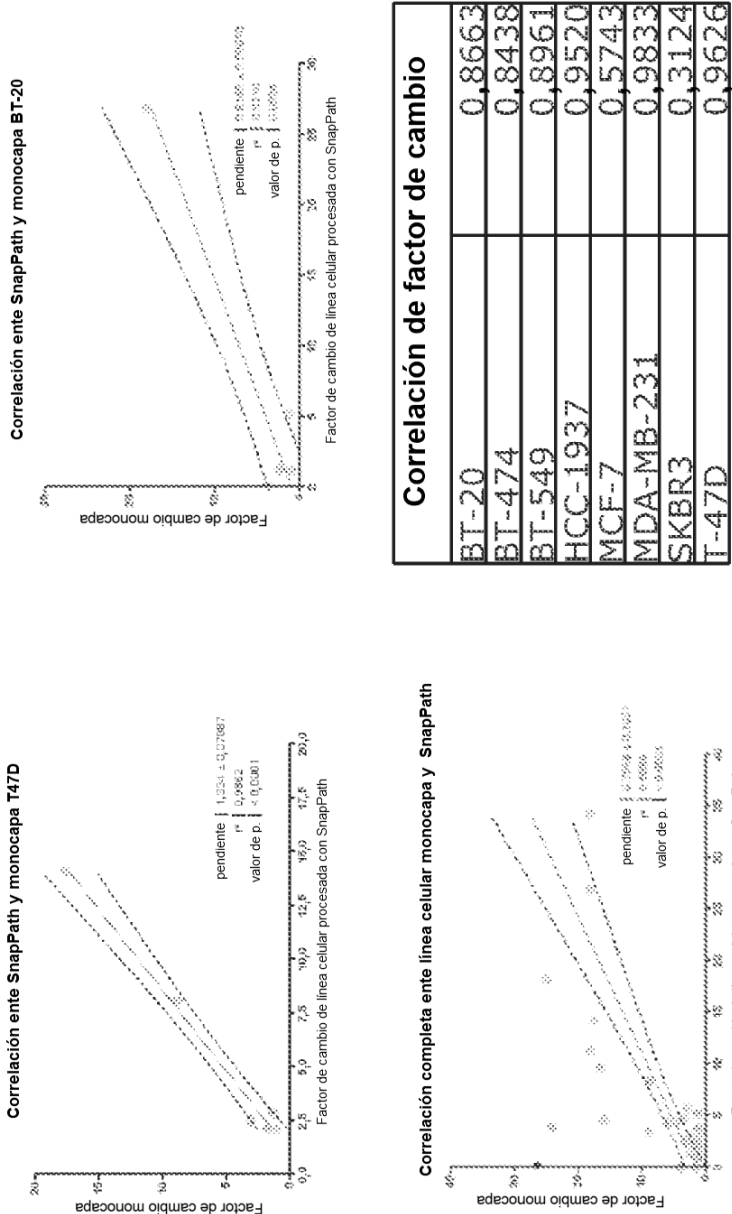


Fig. 8

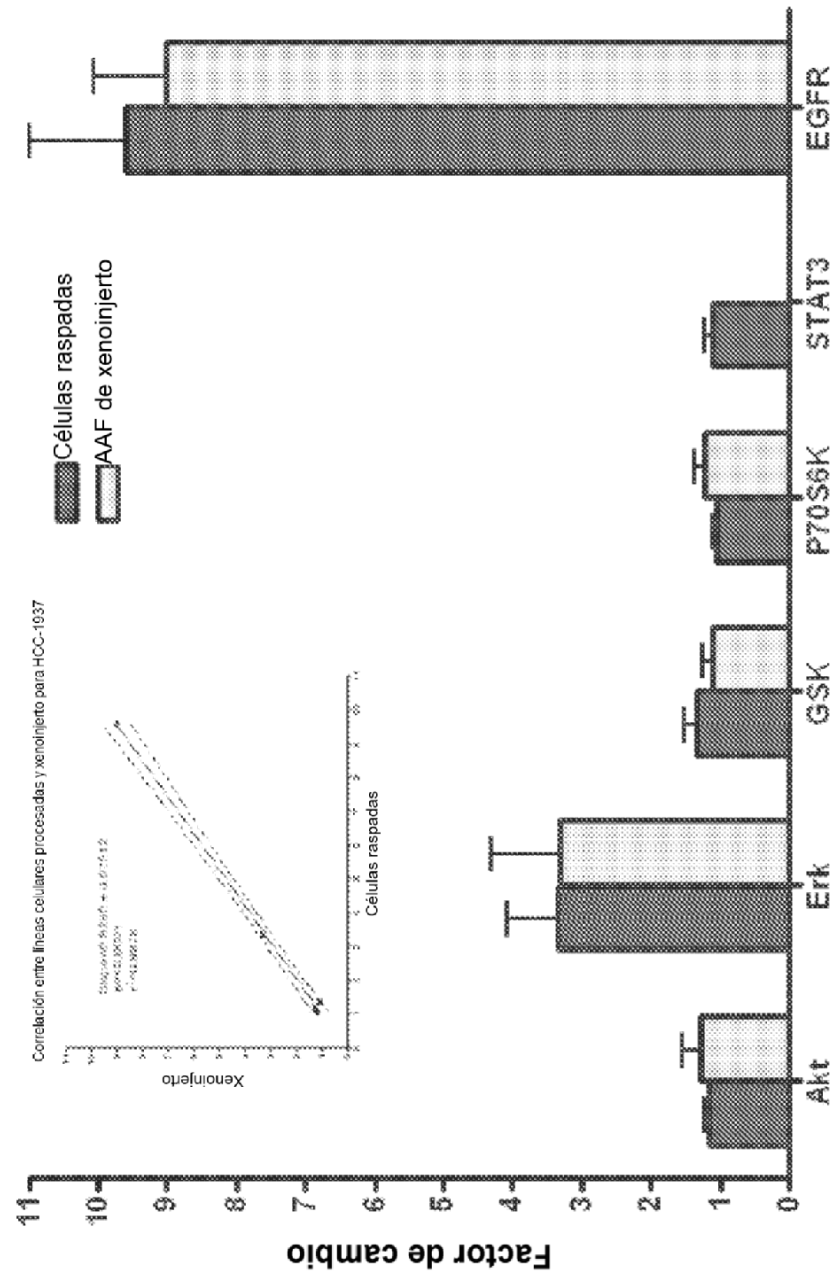


Fig. 9

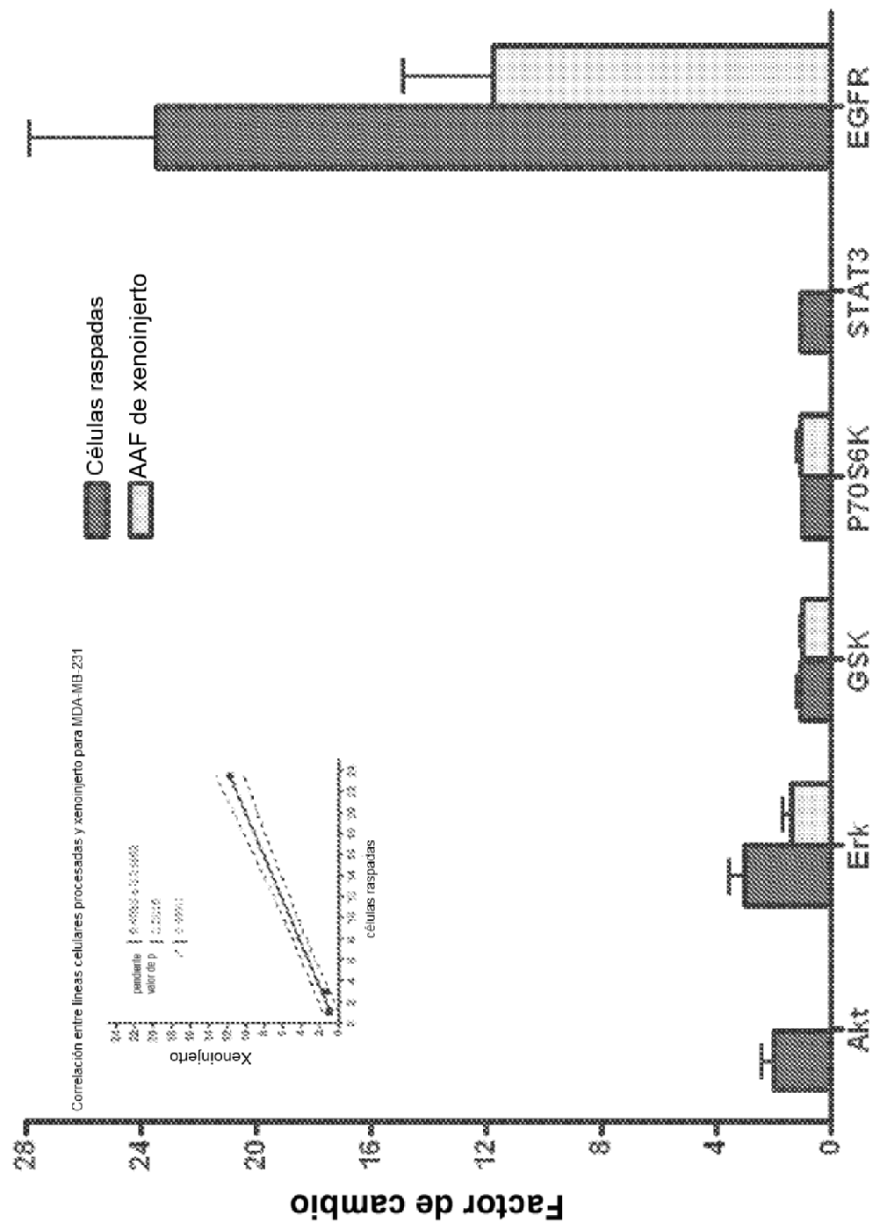


Fig. 10

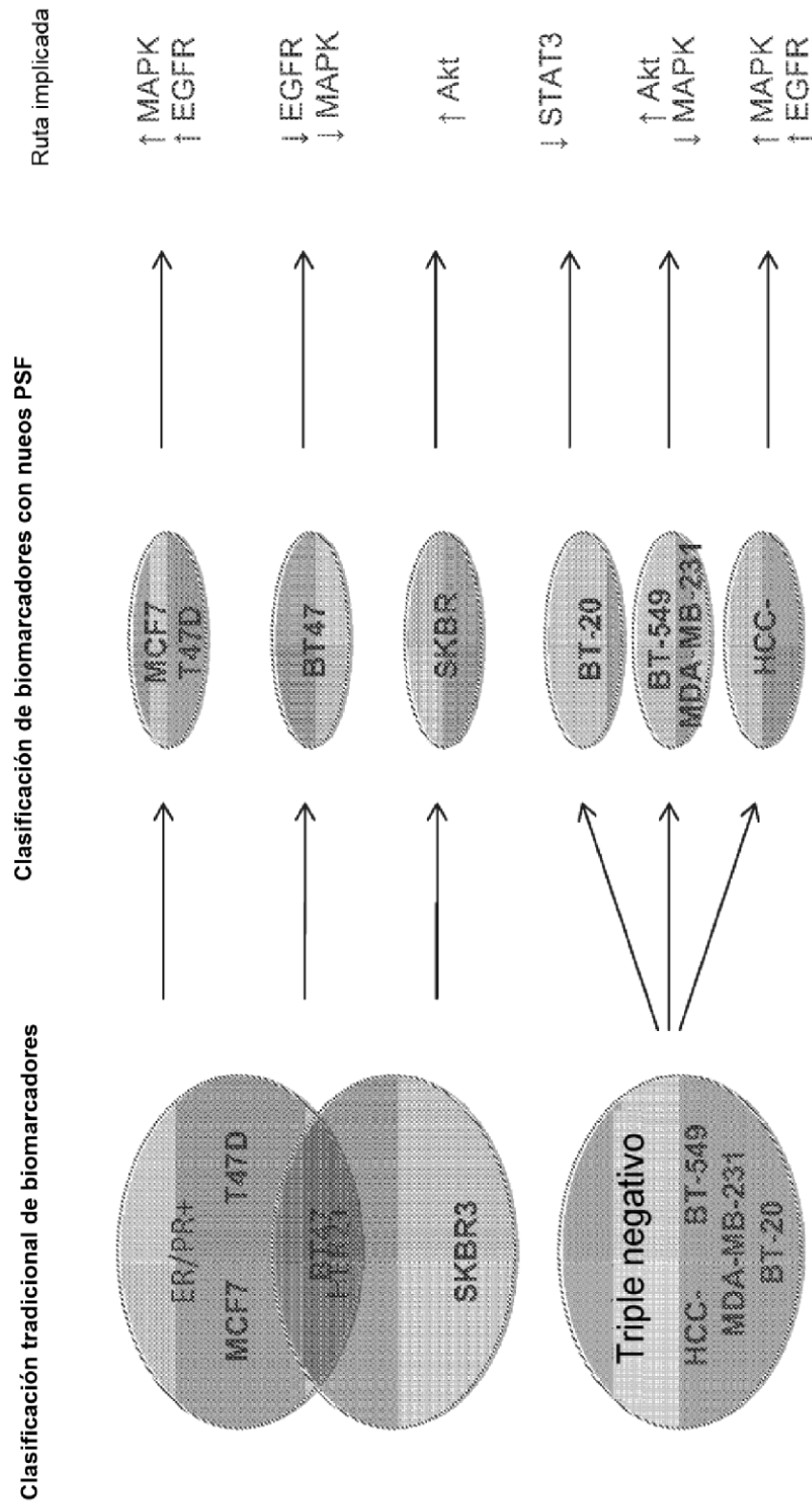


Fig. 12

Posible sensibilidad al fármaco asociada a perfiles de señalización funcionales de TNBC

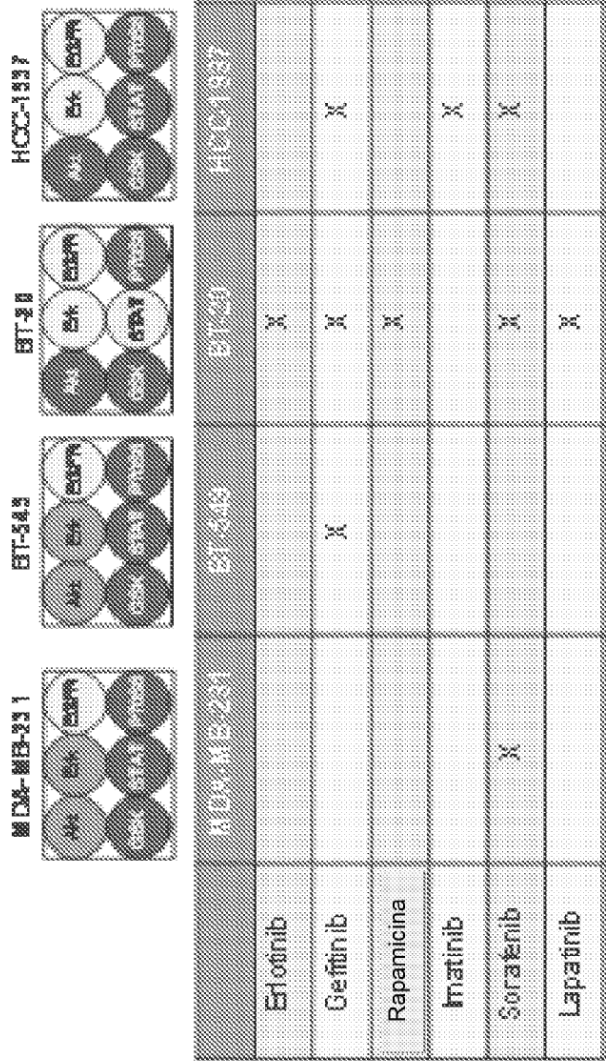
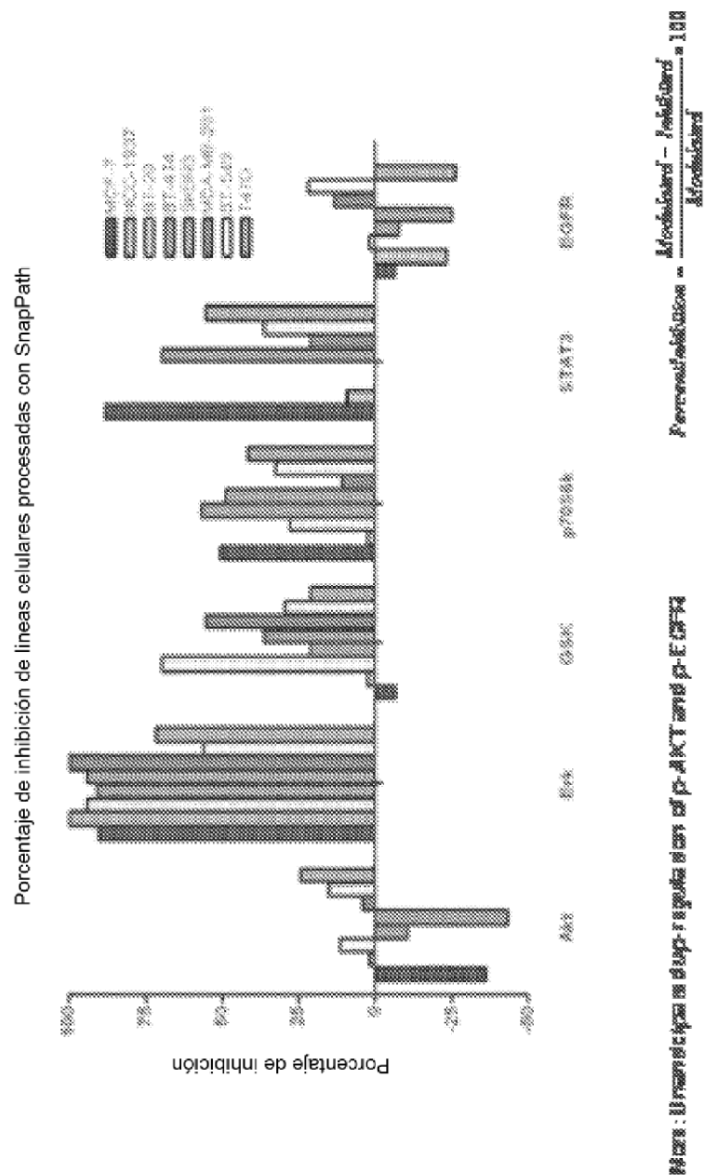


Fig. 13

La estratificación ex vivo y el análisis de circuitaría funcional celular es posible a través de inhibición de fármacos en el sistema SnapPath™



ॐ नमो भगवते वासुदेवाय

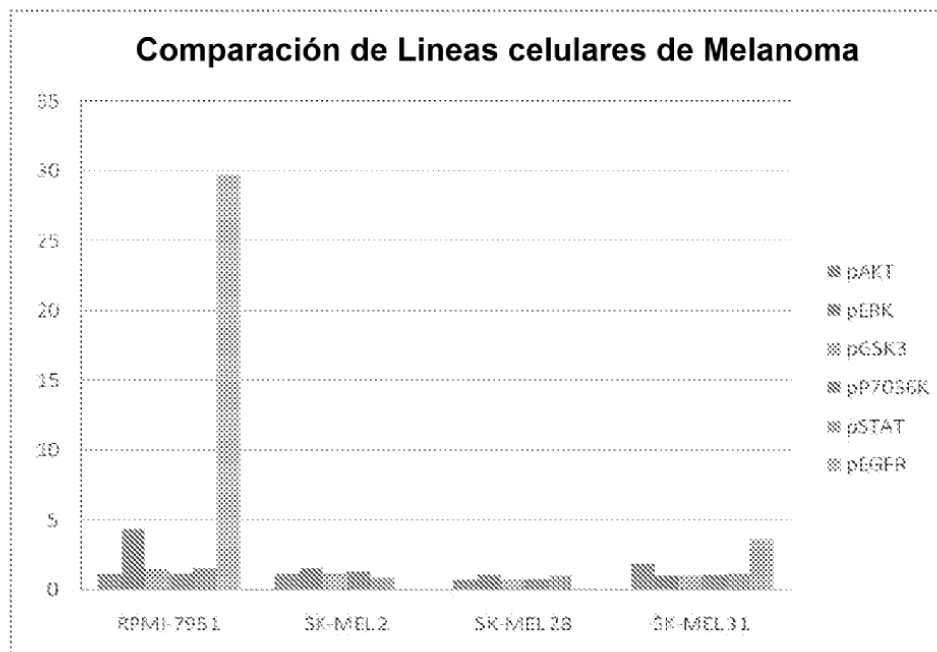


Fig. 15

Perfiles de señalización funcionales de melanoma (inhibición)

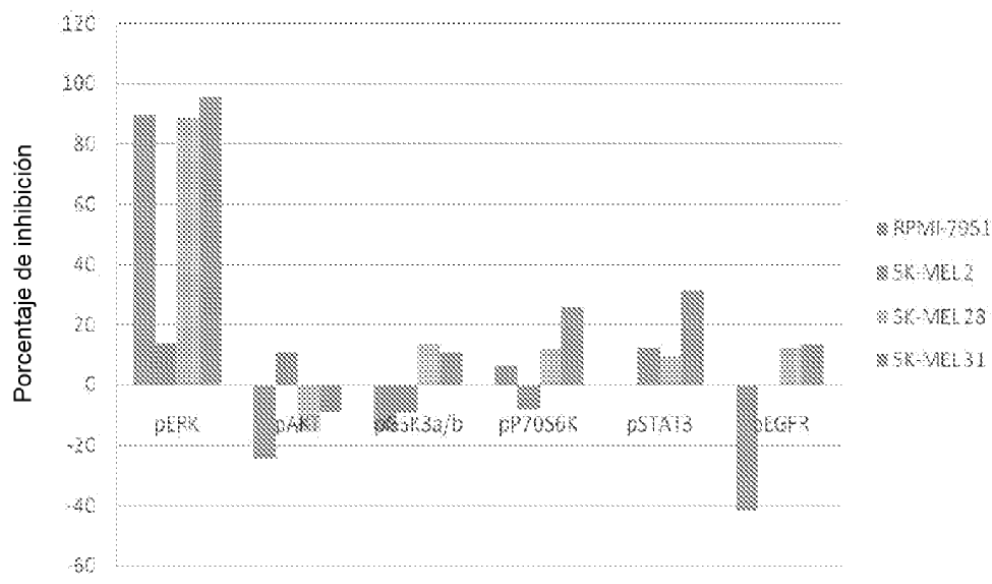


Fig. 16

**Perfiles de señalización funcionales
de Melanoma - Modulación con TPA**

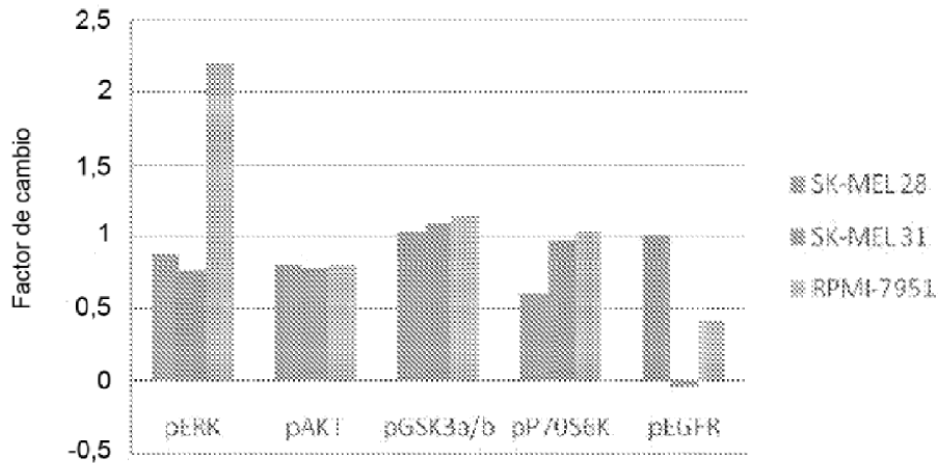


Fig. 17

Perfiles de señalización funcionales de Tumor pancreático

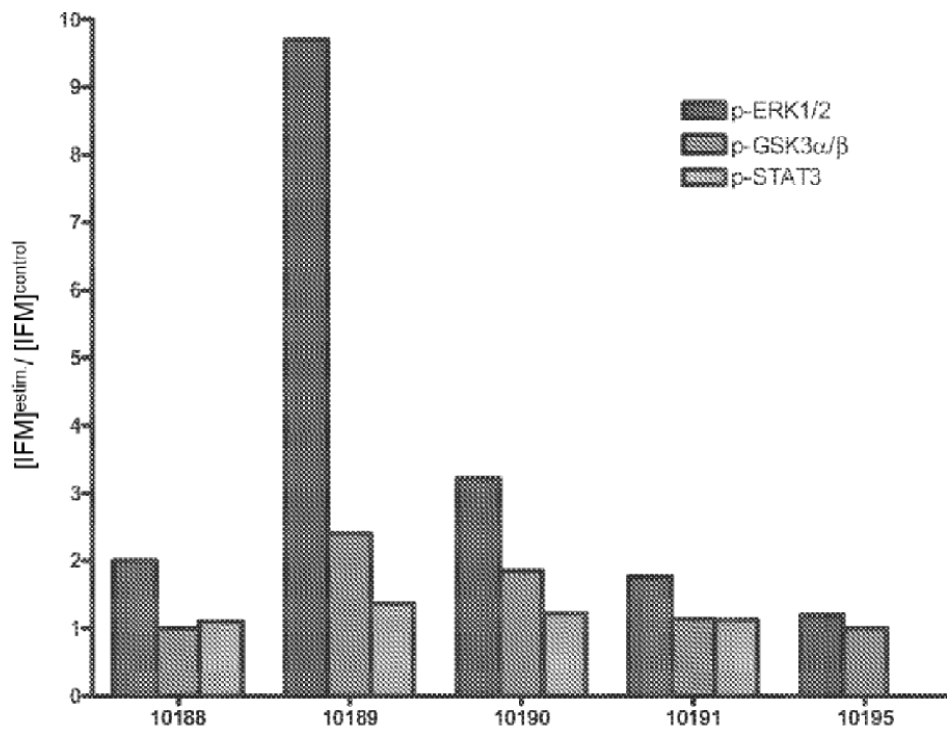


Fig. 18

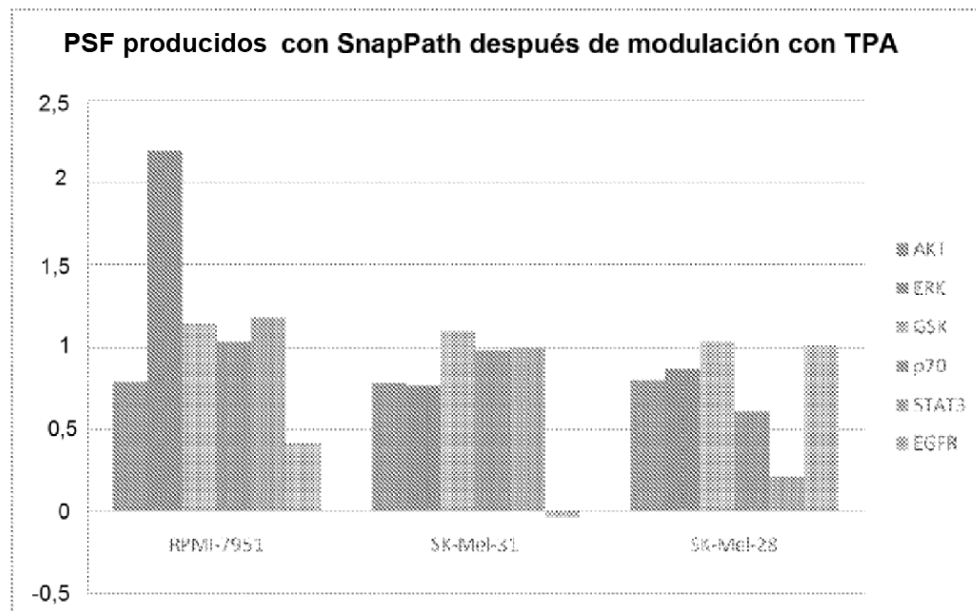


Fig. 19

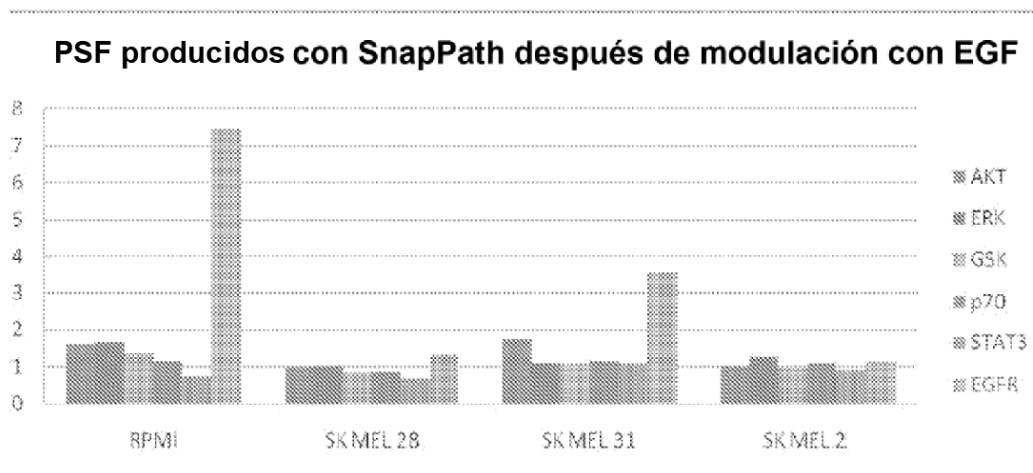


Fig. 20

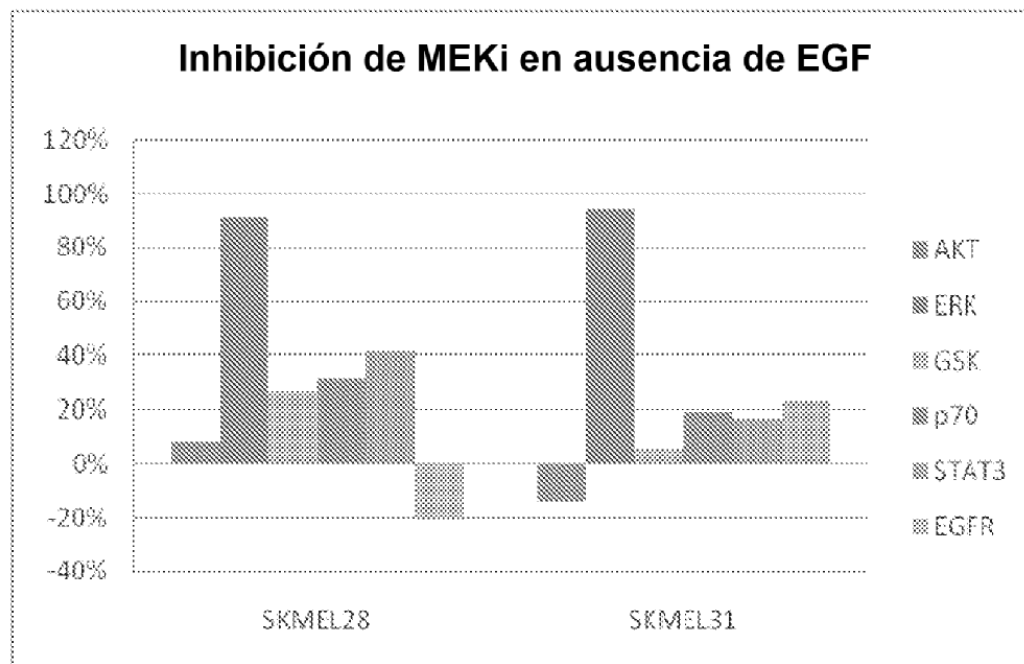


Fig. 21

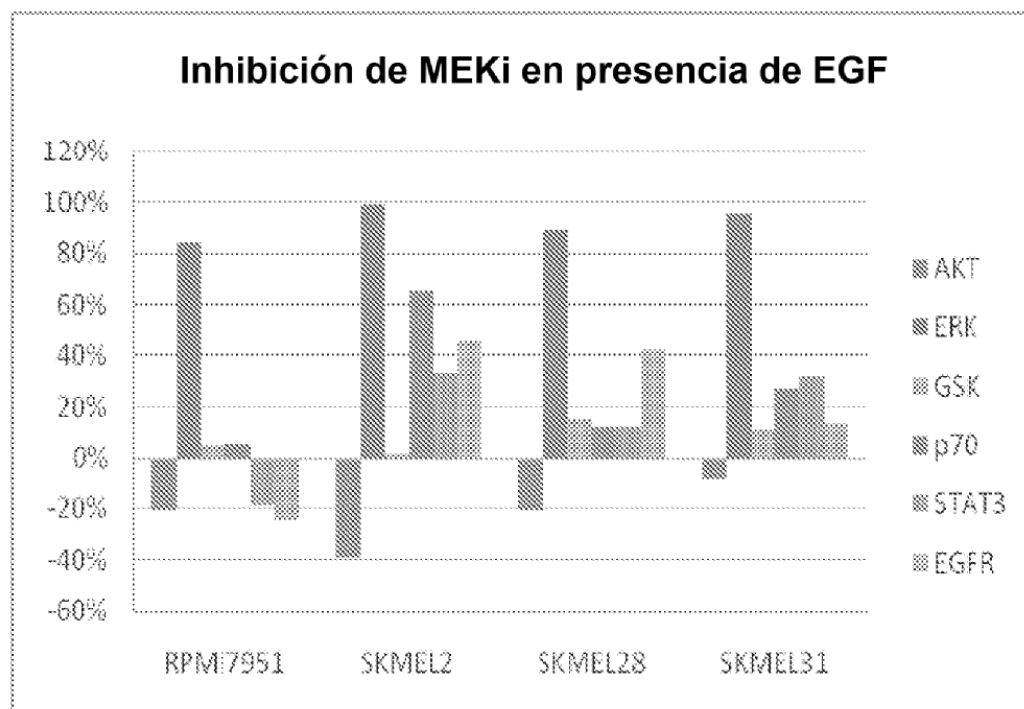


Fig. 22

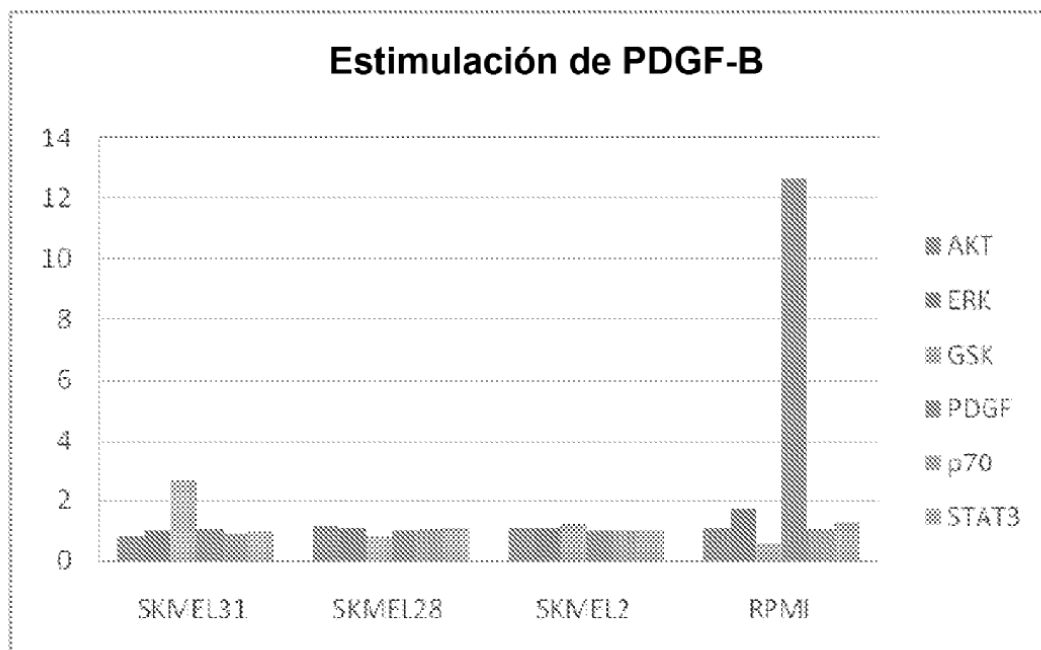


Fig. 23

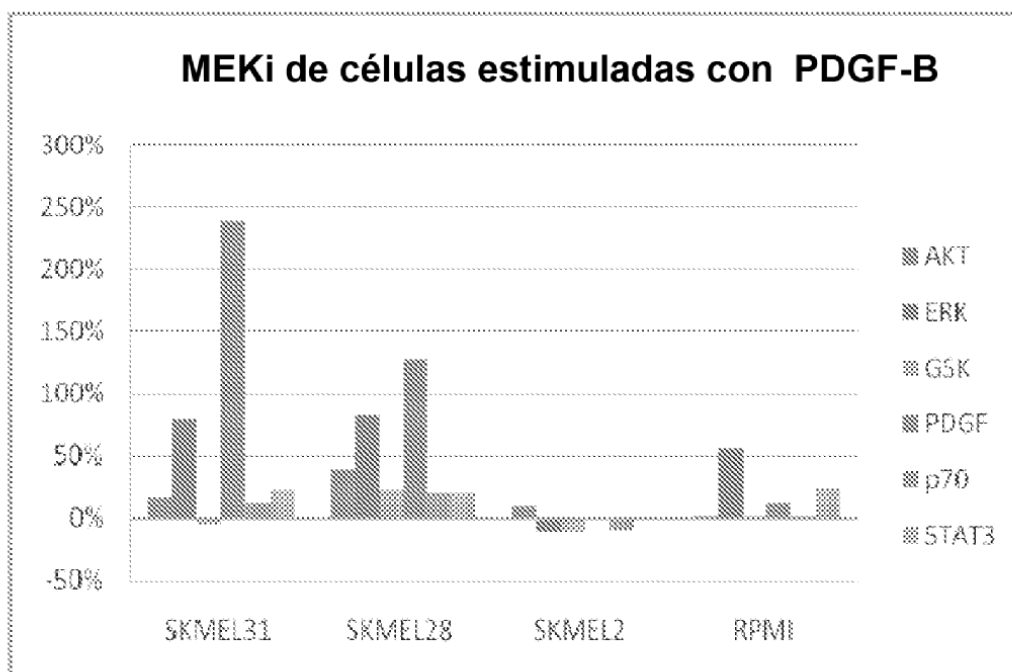


Fig. 24

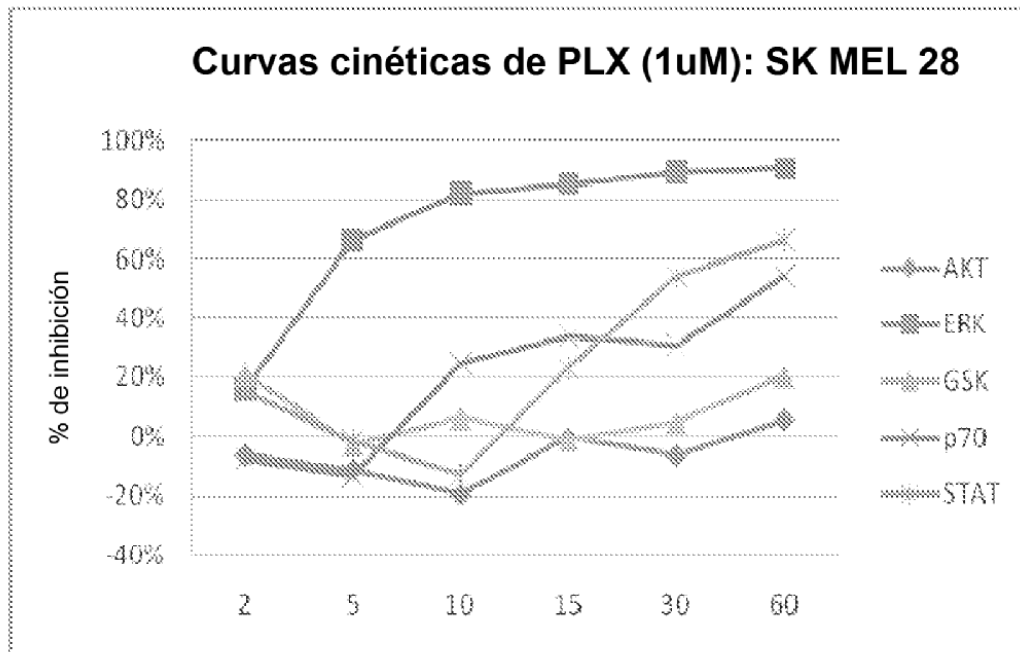


Fig. 25

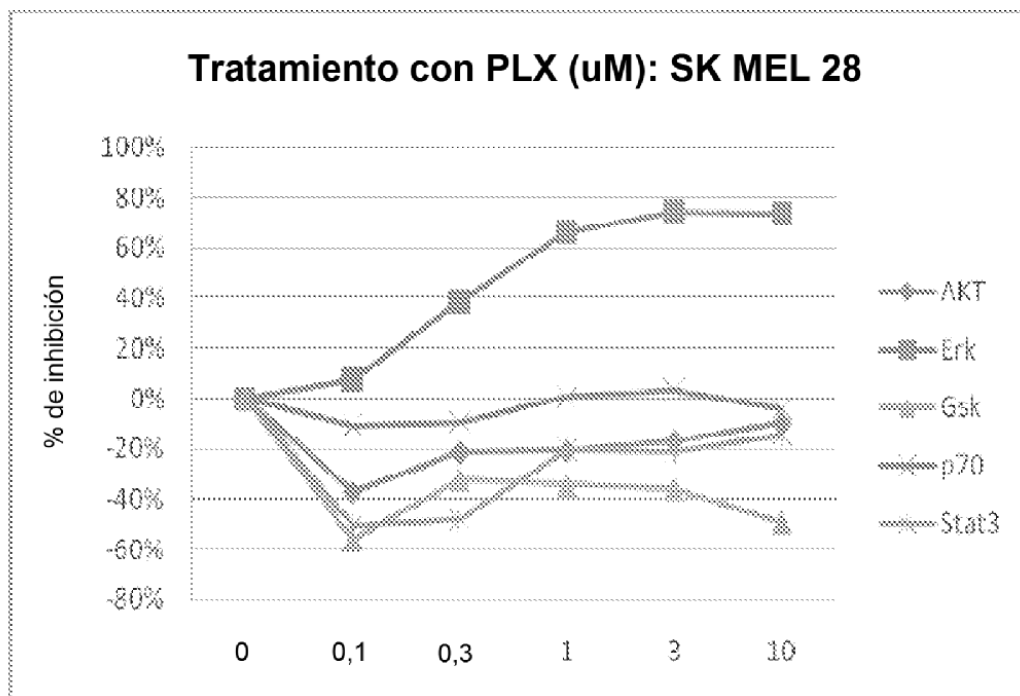


Fig. 26

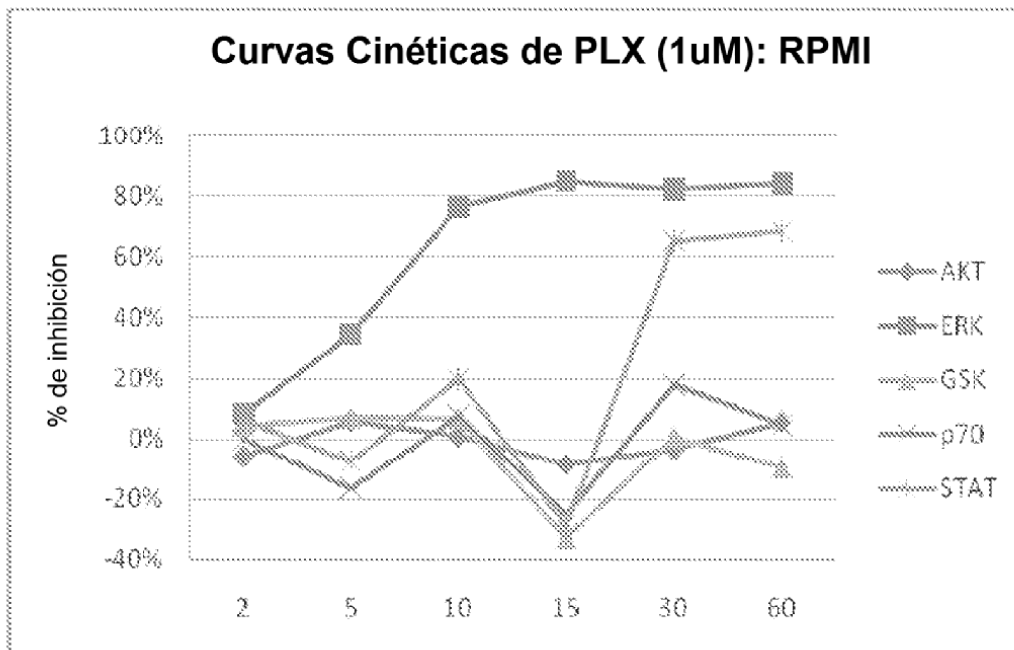


Fig. 27

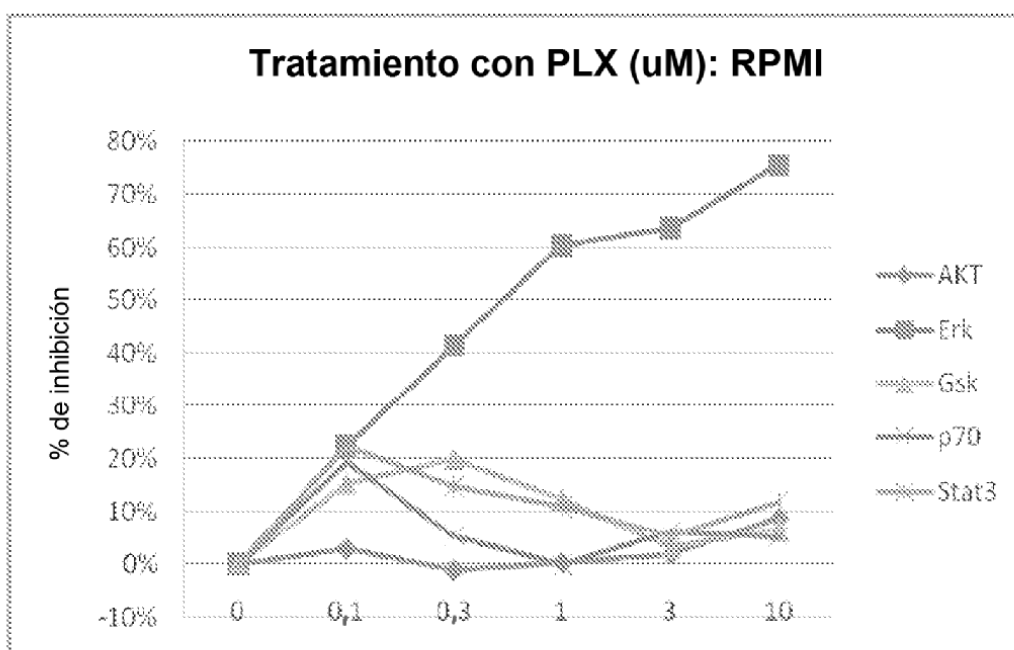


Fig. 28

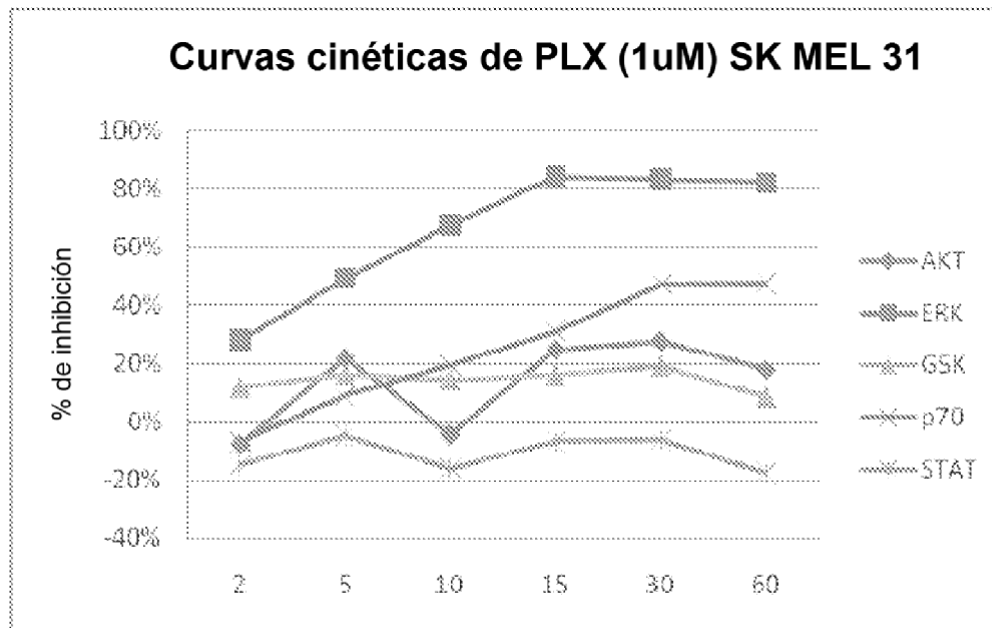


Fig. 29

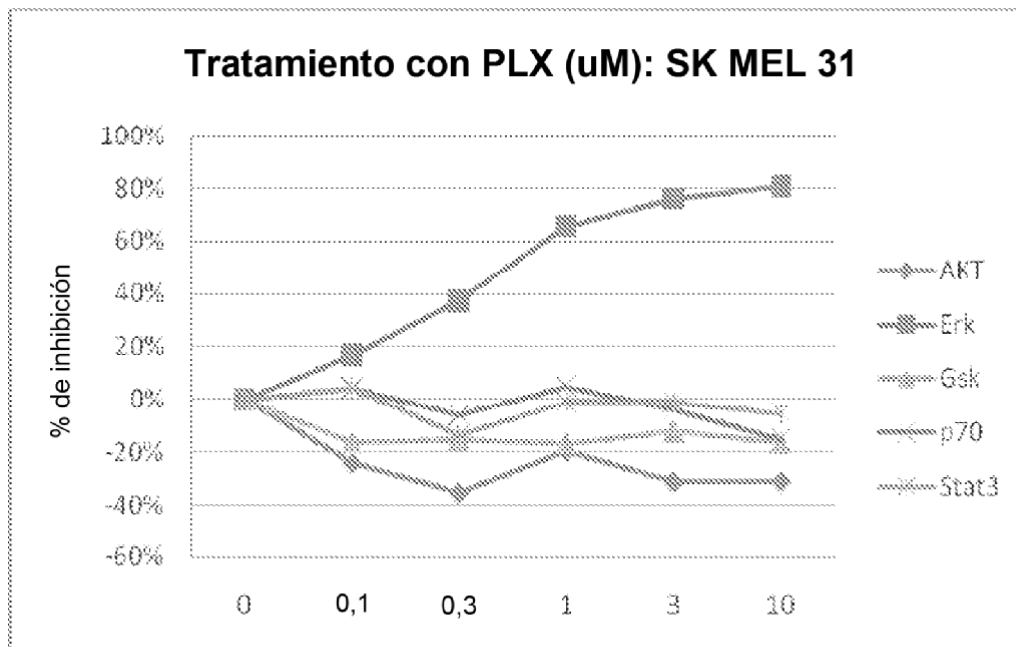


Fig. 30

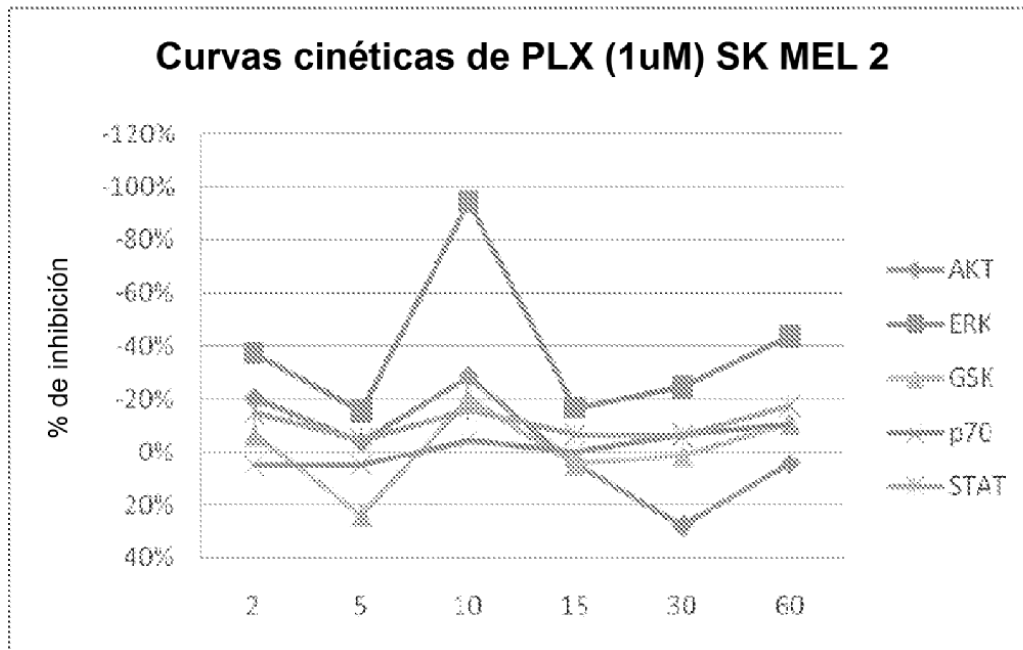


Fig. 31

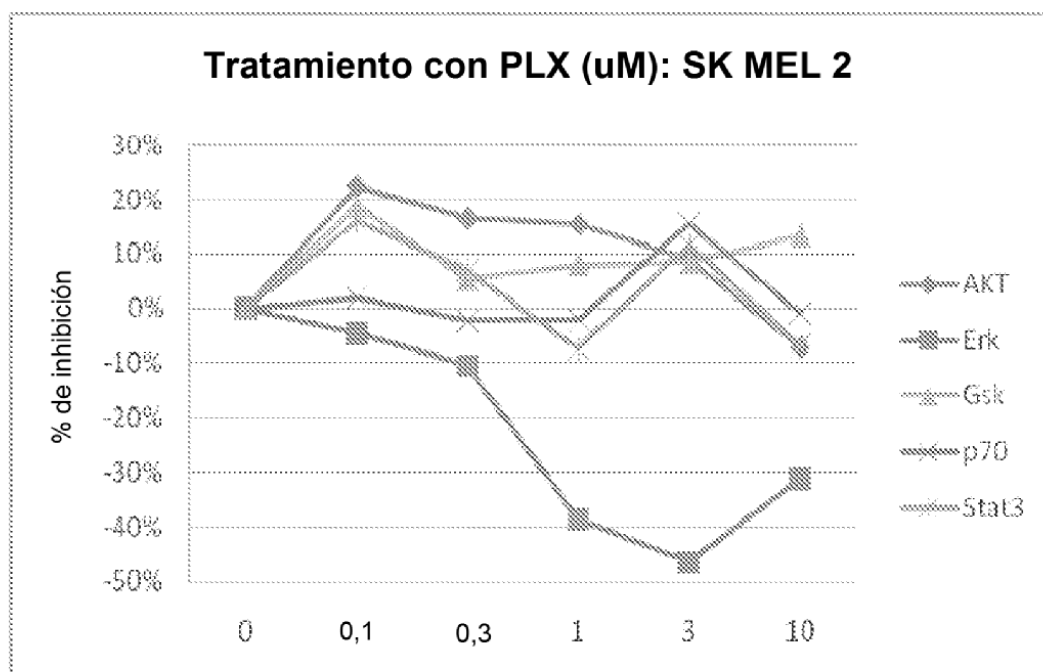


Fig. 32

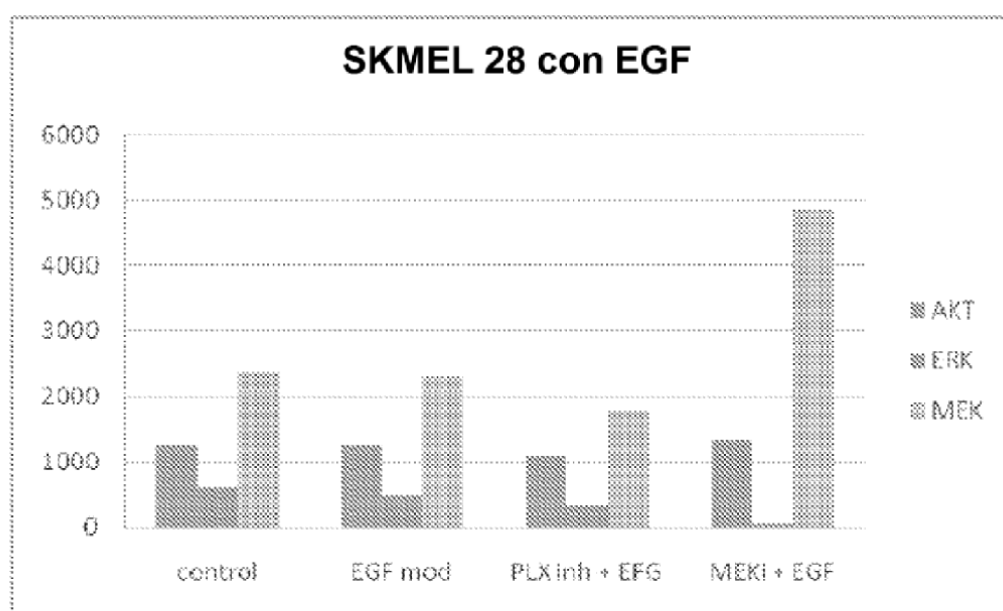


Fig. 33

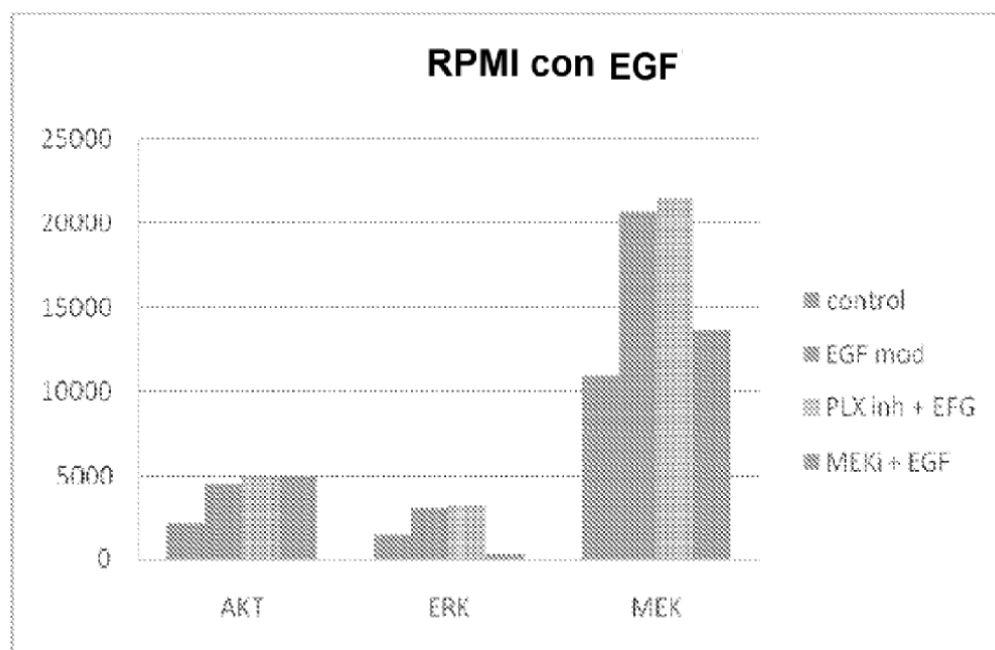


Fig. 34

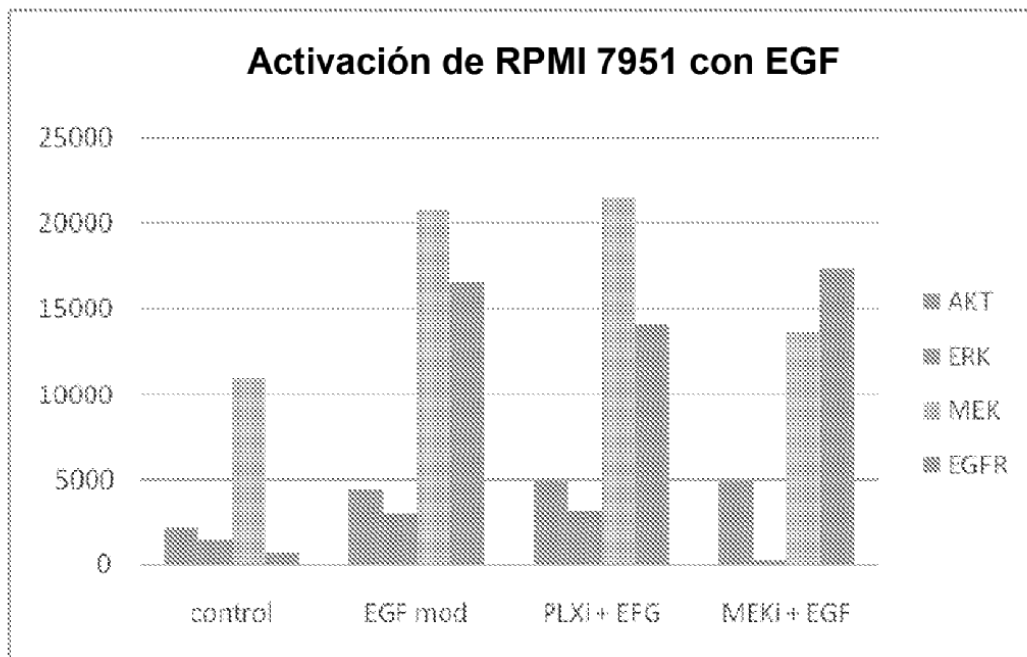


Fig. 35

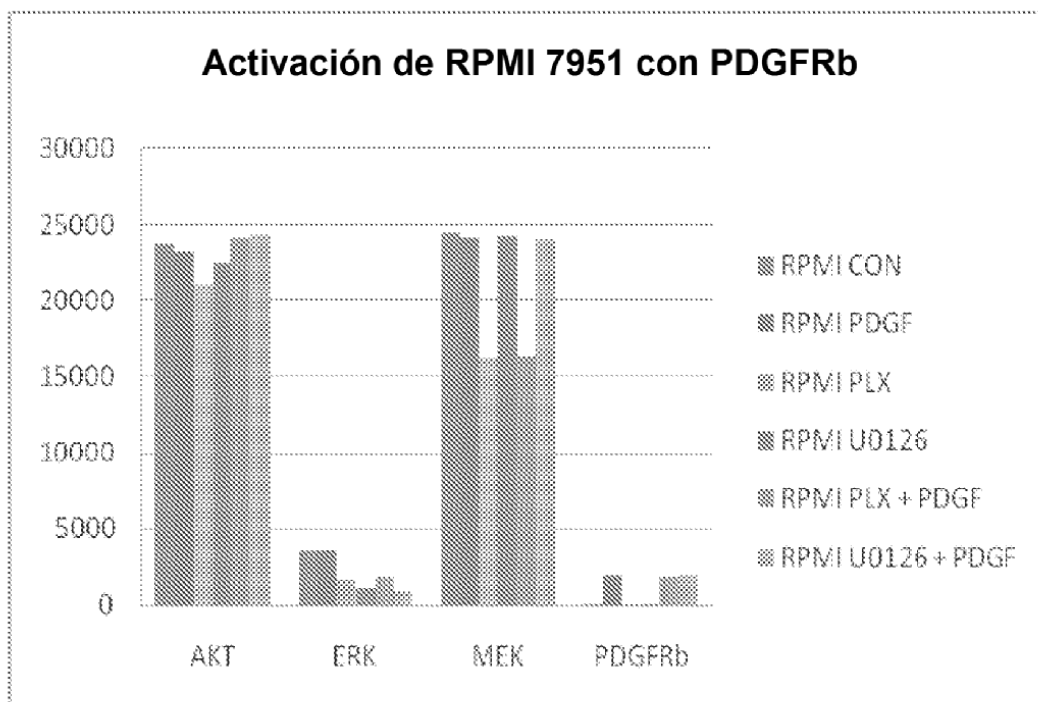


Fig. 36