

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 662**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.01.2009 PCT/US2009/031395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2009 WO09092068**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2009 E 09703015 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2240781**

54 Título: **Métodos para detectar distintivos de enfermedades o afecciones en fluidos corporales**

30 Prioridad:

18.01.2008 US 22033 P
18.06.2008 US 73434 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2018

73 Titular/es:

**PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD
COLLEGE (100.0%)
28 SOUTH STREET
CHESTNUT HILL, MA 02467, US**

72 Inventor/es:

KASSIS, AMIN, I.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 663 662 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para detectar distintivos de enfermedades o afecciones en fluidos corporales

Campo

5 La presente invención se refiere a métodos *in vitro* para identificar marcadores de afecciones tales como los distintivos genómico, proteómico, metabolómico, glucómico, glicoproteómico, lipidómico y/o lipoproteómico de tumores en células obtenidas a partir de fluidos corporales de un paciente.

Antecedentes

10 Los tumores se originan a partir de células normales tras la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas. Este proceso de múltiples pasos implica múltiples alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de las células normales a un fenotipo maligno. Estas alteraciones están compuestas por cambios irreversibles en la secuencia de ADN (por ejemplo, mutaciones, eliminaciones, translocaciones) y conducen a la activación de oncógenos, a la inactivación de genes supresores de tumores y a la fusión de genes. La naturaleza estocástica de estos eventos confiere heterogeneidad genética que da a las células transformadas huellas digitales moleculares (por ejemplo, uno o más componentes celulares tales como ADN, ARN, proteína, lípidos, carbohidratos y similares) indicativos de cáncer que les dan fenotipos únicos. En consecuencia, se sabe que los características/distintivos únicos del conjunto de genes son expresados por diversos tumores (Perou et al (2000) Nature A06: 7A7; Lobenhofer et al (2001) Health Perspect. 109: 881; van't Veer et al. 2002) Nature 415: 530 (2002); Liotta and Kohn (2003) Nat. Genet. 33:10; Ginos et al (2004) Cancer Res. 64:55; Liu (2005) Proc. Natl. Acad. Scl. USA 102: 3531; Grigoriadis et al (2006) Breast Cancer Research 8: R56).

20 Tanto los tumores primarios como los metastásicos pueden permanecer silentes y sin ser detectados durante años. Sin embargo, estos tumores inactivos y ocultos, así como los tumores sólidos primarios y metastásicos previamente diagnosticados, liberan diariamente en la circulación aproximadamente de uno a seis millones de células por gramo de tumor. Una gran proporción de estas células tumorales circulantes, conocidas como CTC, sufren apoptosis y mueren, mientras que poblaciones celulares distinguibles pueden convertirse en enfermedad metastásica. Los cuerpos apoptóticos de células tumorales, ADN, nucleosomas, ARN y proteínas también se encuentran en la sangre de pacientes con cáncer. Holmgren et al., Blood 93, 3956 (1999). Se han realizado esfuerzos para investigar si se pueden identificar los distintivos de tumores y si se pueden usar para detectar o controlar el cáncer. Véase, Ransohoff, Nature Reviews Cancer 5, 142 (2005) and McLerran et al., Clin. Chem. 54, 44 (2008).

30 El ADN se puede transfectar fácilmente en diversas células eucariotas, es decir, una vez que se internaliza en el citoplasma de las células, puede integrar sus genes en el genoma de la célula huésped. Por ejemplo, los neutrófilos y macrófagos pueden transfectarse rápida y muy eficientemente (50%-90%). También se ha demostrado el paso de ADN de células procarionotas a eucarióticas y se cree que se produce desde células eucariotas a células eucariotas. El ADN liberado de las células tumorales tiene una alta actividad de transformación. La adición de medio sobrenadante de células tumorales cultivadas a células normales da como resultado la aparición de tantos focos transformados como los que se producen después de una transfección con un gen ras clonado administrado como un precipitado de calcio. Además, cuando se inyectaron ratas sanas con plasma de ratas portadoras de tumores (que por lo tanto contenían ADN tumoral), se encontró el gen marcador tumoral en el ADN de sus células pulmonares, es decir, se transcribieron genes tumorales en células de pulmón.

40 Los leucocitos comienzan como células madre hematopoyéticas pluripotentes en la médula ósea y se desarrollan a lo largo del linaje mielóide (monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos) o el linaje linfóide (linfocitos T y B y células asesinas naturales). La función principal de las células del linaje mielóide (por ejemplo, neutrófilos y macrófagos) es la fagocitosis de organismos infecciosos, células dañadas no deseadas, células senescentes y muertas (apoptóticas y necróticas), así como la eliminación de restos celulares. Los fagocitos de animales sanos no se replican y son diploides, es decir, tienen un índice de ADN de uno. En promedio, cada célula contiene <10 ng de ADN, <20 ng de ARN y <300 ng de proteína.

50 Se han reconocido patrones de variación de expresión génica diferentes, por ejemplo, los asociados con el tipo de célula, el género, la edad, las diferencias interindividuales y similares, en los glóbulos blancos de donantes sanos. Por ejemplo, una aglomeración "asociada a linfocitos" tiene 55 genes únicos. En neutrófilos, también se ha informado de una variabilidad significativa en la expresión de 52 aglomeraciones de genes únicos. Los genes en esta aglomeración se pueden agrupar en tres familias cada vez más específicas: (i) aquellos que se expresan de manera ubicua en muchos tipos de células inmunes circulantes; (ii) los expresados por células del linaje mielóide; y (iii) los específicos para granulocitos.

55 La vida útil de diversas subpoblaciones de glóbulos blancos varía desde unos pocos días (por ejemplo, neutrófilos) hasta varios meses (por ejemplo, macrófagos). Al igual que otros tipos de células, los leucocitos envejecen y eventualmente mueren. Durante su proceso de envejecimiento, los fagocitos derivados de sangre y tejidos humanos (por ejemplo, neutrófilos) exhiben todos los marcadores clásicos de muerte celular programada (es decir, apoptosis), incluyendo activación de caspasa, núcleos picnóticos y fragmentación de la cromatina. Estas células también muestran una serie de indicadores de "devorar" (por ejemplo, fosfatidilserina, azúcares) en las superficies

extracelulares de sus membranas plasmáticas. En consecuencia, las células moribundas y muertas y los fragmentos subcelulares de las mismas son eliminados de los tejidos y la sangre por otras células fagocíticas.

5 La apoptosis de los fagocitos se acelera después de su activación. Por ejemplo, después de la absorción de *S. aureus* por los neutrófilos, la fosfatidilserina se externaliza en sus membranas plasmáticas, lo que conduce a su fagocitosis rápida por los macrófagos. También se ha demostrado que los monocitos activados se unen a diversas líneas de células tumorales con niveles elevados de fosfatidilserina.

10 Se sabe que las células fagocíticas circulantes envuelven CTC vivas y muertas y fragmentos de las mismas, un proceso que conduce a un aumento en los contenidos de ADN (y otros constituyentes celulares) de la célula fagocitaria. Por ejemplo, se ha demostrado que las células tumorales apoptóticas son fagocitadas por macrófagos y células dendríticas. Como consecuencia de dicha actividad fagocítica, se ha demostrado que los macrófagos sanguíneos obtenidos de pacientes con cáncer de próstata contienen niveles intracelulares mucho más altos de antígeno prostático específico (PSA) que los macrófagos obtenidos de pacientes con afecciones benignas de próstata. Véase, Herwig et al., *Clinical Prostate Cancer* 3, 184 (2004) and Herwig et al., *Prostate* 62 290 (2005). Se cree que esto es una consecuencia de fagocitar células tumorales. Se sabe que las células madre fetales, los eritrocitos nucleados y los linfocitos fetales, así como cantidades significativas de ácidos nucleicos fetales libres de células, circulan en la sangre materna. Ver Cheung et al., *Nat. Genet.* 14, 264 (1996). El documento US 2007/0134689, por ejemplo, describe un método para diagnosticar cáncer de ovario en una etapa temprana comparando un perfil de expresión de marcador tumoral de una muestra de tejido de cáncer de ovario con el perfil de un individuo sano. Sin embargo, como muchas otras formas de tumores y cáncer existen con una tasa de mortalidad aún mayor, por ejemplo, cáncer de pulmón, mama y próstata, es de interés social identificar más marcadores que permitan el diagnóstico de una célula cancerosa en un individuo en una etapa temprana.

15 También se ha demostrado que cuando los cuerpos apoptóticos (fragmentos celulares encapsulados en la membrana) derivados de células de linfoma de Burkitt humanas se cultivan con monocitos humanos (fagocíticos) o células musculares lisas vasculares (no fagocíticas), los monocitos muestran un alto porcentaje de células específicas del gen de tumor de Epstein-Barr (EBV), mientras que las células de músculo liso exhiben aproximadamente una frecuencia de captación y expresión de 0.01%.

20 Se necesitan métodos que permitan el diagnóstico temprano *in vitro* de la presencia de enfermedad (por ejemplo, tumores) en individuos, por ejemplo, individuos que no se sabe que tienen la enfermedad o que tienen enfermedad recurrente. Un objeto de la presente invención es facilitar la detección de marcadores específicos de enfermedad (por ejemplo, específicos de tumor), por ejemplo, proteínas, ARN y/o ADN dentro de subpoblaciones de glóbulos blancos (WBCs) de un animal, incluso de un ser humano.

Resumen

25 Las realizaciones de la presente invención se basan en el uso de fagocitos para determinar la presencia o ausencia de marcadores asociados con ciertas enfermedades o afecciones. De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, los fagocitos incorporan células y/o fragmentos y/o componentes de los mismos que circulan en la sangre que son característicos de una enfermedad o condición particular. Los contenidos de los fagocitos proporcionan un perfil marcador para la enfermedad o condición, por ejemplo, a través del contenido de ADN y/o proteínas en la célula o a través de la expresión de ADN o proteína por la célula. La comparación de los perfiles de expresión de ADN de glóbulos blancos fagocítica y no fagocítica condujo a la detección de distintivos de ADN específicas de tumor dentro de células fagocíticas que o bien no se expresaban o bien se subexpresaban en la célula no fagocítica. Del mismo modo, los perfiles de expresión de proteínas de glóbulos blancos fagocítica y no fagocítica conducen a la detección de distintivos de proteínas tumorales específicas dentro de las células fagocíticas que no se expresaron o subexpresaron en la célula no fagocítica. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención identifican la presencia de tumores sólidos (por ejemplo, lesiones primarias y metastásicas) en un individuo sospechoso de tener cáncer y o identificar la presencia de cáncer antes de la manifestación de signos y síntomas patológicos, y detectar la recurrencia de la enfermedad.

30 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que los componentes de células sanguíneas, tales como células fagocíticas y células no fagocíticas, de un individuo son idealmente adecuados para la identificación fácil y la diferenciación de distintivos específicos no tumorales y normales, y por lo tanto la eliminación de la desigualdad de la línea de base como consecuencia de las variaciones interindividuales intrínsecas (por ejemplo, edad, género, origen étnico, estado de salud) y temporales en las expresiones génicas.

35 En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, métodos *in vitro* para la identificación de distintivos específicos de tumor dentro de los glóbulos blancos (obtenidos de la sangre u otros fluidos corporales, por ejemplo, orina, heces, saliva, linfa, fluido cerebroespinal y similares) de un individuo sospechoso de tener cáncer. Las realizaciones de la presente invención proporcionan resultados específicos del paciente y no dependen de los perfiles de distintivo promedio derivados de la población y los valores obtenidos de controles "sanos", es decir, los distintivos de referencia/fondo es(son) específicos para el perfil genómico, proteómico, metabolómico, glicoproteómico y/o lipoproteómico del individuo que se evalúa. Las realizaciones de la presente invención proporcionan una predisposición personalizada para el cribado, el diagnóstico y el control de la enfermedad.

En ciertas realizaciones y con referencia a la Figura 1, la presente invención se basa en la capacidad de las células fagocíticas para englobar e ingerir células viables, moribundas y muertas (por ejemplo, células apoptóticas, células necróticas y similares), partículas subcelulares y/o fragmentos de los mismos (cuerpos cajal, membrana celular, centriolos, centrosomas, gemas, aparato de Golgi, lisosomas, mitocondrias, membrana nuclear, núcleos, nucléolos, paraspeles, cuerpos de leucemia promielocítica (cuerpos de PML), ribosomas, retículo endoplásmico rugoso, endoplásmico liso retículo, vacuolas, vesículas, microvesículas y similares) y restos celulares, por ejemplo cromosomas, ADN (nuclear y mitocondrial), exones, genes, intrones, proteínas, proteínas que se unen a carbohidratos, glicoproteínas, lipoproteínas, ARN, microARN, cuerpos apoptóticos, núcleos, microvesículas, exosomas, nucleosomas, asociaciones polimórficas interfases cariosales (PIKA), puntos de empalmes, y similares), y la ausencia de estas características en células no fagocíticas. Por consiguiente, el análisis de ADN (nuclear, mitocondrial), ARN, microARN, proteína, proteínas de unión a carbohidratos, glicoproteínas, lipoproteínas, cuerpos apoptóticos, núcleos, microvesículas, exosomas y/o nucleosomas y/o perfiles de expresión de glóbulos blancos fagocíticos y su comparación con los de células no fagocíticas obtenidas de la sangre u otros fluidos corporales del mismo donante proporcionan una identificación de los distintivos específicos del tumor dentro de las células fagocíticas (señal específica del paciente) que no se expresan o se expresan significativamente diferencialmente en el no fagocítico células (ruido específico del paciente). Dado que tanto las células fagocíticas como las no fagocíticas surgen de la misma célula madre pluripotente dentro de la médula ósea, la sustracción del perfil de distintivo no asociado al tumor/inducido (identificado en las células no fagocíticas) a partir de los distintivos encontradas en las células fagocíticas permite la identificación de distintivos específicos de tumores en la muestra del paciente particular como se muestra en la Figura 2. De acuerdo con ciertas otras realizaciones, los restos celulares en los fluidos corporales se internalizan mediante entosis (absorción celular), endocitosis y pinocitosis.

De acuerdo con una realización de la presente invención y con referencia a la Figura 3, se obtiene una muestra de sangre de un individuo con la muestra de sangre que incluye tanto células fagocíticas como no fagocíticas (por ejemplo, glóbulos blancos). Las células fagocíticas (por ejemplo, neutrófilos, monocitos, células dendríticas de macrófagos, células espumosas) se separan a continuación de células no fagocíticas (por ejemplo, células T, células B, células nulas, basófilos) por diversos métodos *in vitro* conocidos a los expertos en la materia. De acuerdo con la presente invención, el fenotipo de los glóbulos blancos se ve alterado por la fagocitosis de CTC vivas/moribundas/muertas (y fragmentos subcelulares de las mismas) y/o ADN, ARN y/o proteína específicos del tumor, presentes en la sangre. La fagocitosis conduce a la internalización de estos distintivos tumorales en la célula fagocítica y posiblemente a la integración del ADN de la célula tumoral con sus mutaciones somáticas específicas del tumor (u otras mutaciones relacionadas con la enfermedad) en el ADN de la célula fagocítica normal (es decir, su transfección del cromosomas de la célula objetivo). La posterior transcripción del ADN "transfectado" de células fagocíticas en ARN y la traducción de este último en proteínas produce un fenotipo diferente de los glóbulos blancos no fagocíticos.

Por lo tanto, la comparación usando métodos genómicos, proteómicos, metabolómicos, glicoproteómicos y/o lipoproteómicos conocidos por los expertos en la técnica del ADN, ARN y/o proteína, perfiles de expresión de glóbulos blancos fagocíticos y no fagocíticos (como mostrado en la Figura 3) obtenido de un individuo con cáncer se usa para identificar los distintivos perfiles específicos del tumor y/o selectivamente en las células fagocíticas que confirman la presencia de tumores ocultos en el individuo. De acuerdo con la presente invención, la sustracción de los perfiles de ADN, ARN y/o proteína de células fagocíticas de células no fagocíticas proporciona un método *in vitro* para la identificación (por ejemplo, después de análisis genómico, proteómico, metabolómico, glicoproteómico y/o lipoproteómico) de distintivos específicos de tumor en una muestra de sangre (y/u otra muestra biológica) de un paciente en particular y significan la presencia de tumores ocultos como se muestra en la Figura 2.

En ciertas realizaciones de ejemplo, se separan las células fagocíticas y no fagocíticas (por ejemplo, obtenidas de la sangre o una o más de otras muestras biológicas (por ejemplo, orina, heces, saliva, linfa, fluido cerebrospinal y similares). Puesto que la fagocitosis de CTC (y fragmentos subcelulares de los mismos) por glóbulos blancos fagocítica conduce a la internalización de las células tumorales en el citoplasma de las células fagocíticas, la cantidad de ADN, ARN y/o proteína dentro de las células fagocíticas será mayor que la de las células no fagocíticas. Por lo tanto, la comparación de la cantidad y el perfil de estos componentes entre las células fagocíticas y no fagocíticas se usa como una indicación de la presencia de cáncer.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método *in vitro* para diagnosticar la presencia de una célula cancerosa en un individuo. El método incluye los pasos de obtener un primer perfil de expresión de una célula fagocítica sanguínea de un individuo, obteniendo un segundo perfil de expresión de una célula no fagocítica sanguínea del individuo, comparando el primer y segundo perfil de expresión, identificando la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos para el primer perfil de expresión, y relacionan la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos del primer perfil de expresión con la presencia de una célula cancerosa en el individuo.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método *in vitro* para identificar un distintivo específico de tumor en un individuo que tiene cáncer. El método incluye los pasos de obtener un primer perfil de expresión de una célula fagocítica sanguínea de un individuo que tiene cáncer, obteniendo un segundo perfil de expresión de una célula no fagocítica de la sangre del individuo que tiene cáncer, comparando el primer y segundo perfil de expresión, identificando el diferencial expresión de dos o más marcadores específicos del primer perfil de expresión, y relación

de la expresión diferencial de los dos o más marcadores específicos de un distintivo específico del tumor en el individuo que tiene cáncer.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, se proporciona un método *in vitro* para diagnosticar la presencia de una célula cancerosa en un individuo que incluye las etapas de obtener un primer perfil de expresión de una célula fagocítica sanguínea de un individuo y obtener un segundo perfil de expresión de una célula no fagocítica de la sangre del individuo. El método incluye las etapas de comparar los perfiles de expresión primero y segundo, identificar la presencia de una célula tumoral circulante o un fragmento subcelular de la misma específica para el primer perfil de expresión, y relacionar la presencia de una célula tumoral circulante o fragmento subcelular de la misma con la presencia de una célula cancerosa en el individuo. En ciertos aspectos, un aumento en la cantidad de un marcador en el primer perfil de expresión con relación al segundo perfil de expresión indica la presencia de una célula tumoral circulante o un fragmento subcelular de la misma.

En ciertas realizaciones de ejemplo y con referencia a las Figuras 4-6, se proporciona un método *in vitro* para diagnosticar la presencia de una célula cancerosa en un individuo que incluye las etapas de aislar una población de células fagocíticas de un individuo y separar $2n$ células fagocíticas de $>2n$ células fagocíticas. El método incluye los pasos de obtener un primer perfil de expresión de las células fagocíticas $2n$, obtener un segundo perfil de expresión de las células fagocíticas $>2n$, comparar el primer y segundo perfil de expresión e identificar la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos del primer perfil de expresión. El método también incluye la etapa de relacionar la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos del primer perfil de expresión con la presencia de una célula cancerosa en el individuo.

En ciertos aspectos de los métodos *in vitro* descritos en este documento, los marcadores incluyen ADN, ARN, microARN (por ejemplo, ADN o ARN que corresponden al gen del cáncer, oncógeno, un gen supresor tumoral o cualquier combinación de estos), proteína (por ejemplo, una proteína o polipéptido codificado por un gen de cáncer, oncógeno, un gen supresor tumoral o cualquier combinación de estos), y/o cualquier combinación de estos. En ciertos aspectos, una célula fagocítica sanguínea es un neutrófilo, un macrófago, un monocito, una célula dendrítica, un eosinófilo, una célula espumosa o cualquier combinación de estos. En ciertos aspectos, una célula sanguínea no fagocítica es una célula T, una célula B, una célula nula, un basófilo o cualquier combinación de los mismos. En otros aspectos, se aíslan una célula fagocítica sanguínea y una célula no fagocítica de la sangre completa usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como anticuerpos. En otros aspectos más, se aíslan una célula fagocítica sanguínea y una célula no fagocítica de la sangre a partir de una población de glóbulos blancos usando métodos conocidos por los expertos en la materia tales como la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En otros aspectos, la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea se separan usando un ligando que se une a un receptor molecular expresado en las membranas plasmáticas de las poblaciones de leucocitos. En otros aspectos más, la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea están separadas por uno o métodos que incluyen filtración, centrifugación basada en gradiente, elución, microfluidos y similares. En ciertos aspectos, un individuo tiene uno o más de cáncer oculto (por ejemplo, inactivo, no diagnosticado, oculto o escondido), cáncer primario previamente diagnosticado y cáncer metastásico. En ciertos aspectos, un método *in vitro* incluye la etapa de relacionar la presencia de uno o más marcadores con la eficacia de una terapia contra el cáncer.

Los métodos y composiciones *in vitro* descritos en este documento, por lo tanto, permiten la identificación fácil de distintivos específicos de tumor en la muestra de sangre de un paciente, sin depender de los perfiles de distintivo promedio derivados de la población y los valores obtenidos a partir de controles "sanos". Específicamente, los métodos y composiciones *in vitro* descritos en el presente documento pueden fácil y económicamente: (i) identificar la presencia de tumores (lesiones primarias y metastásicas) en un individuo antes de la manifestación de signos y síntomas patológicos; (ii) identificar la presencia de tumores (lesiones primarias y metastásicas) en un individuo sospechoso de tener cáncer; y/o (iii) detectar recidiva tumoral (lesiones primarias y metastásicas) en un individuo sometido/significando varios tratamientos.

Por consiguiente, los métodos y composiciones *in vitro* descritos en el presente documento (i) permiten el cribado no invasivo de cáncer; (ii) permiten el diagnóstico de tumores, especialmente en los puntos de tiempo más tempranos; (iii) mover la(s) intervención(es) significativa(s) a un punto mucho más temprano en el camino de la progresión del tumor, evitando así el desarrollo de enfermedad metastásica; (iv) monitorear la respuesta temprana a tratamientos de rutina o experimentales; (v) predecir la respuesta a tratamientos de rutina o experimentales; (vi) facilitar la selección del tratamiento efectivo permitiendo la identificación rápida de tratamientos ineficaces cuyos efectos secundarios podrían no estar equilibrados por los beneficios esperados; (vii) minimizar la incomodidad e incapacitación del paciente; (viii) permitir que la detección, el diagnóstico y el tratamiento del tumor estén estrechamente acoplados (por ejemplo, personalización de la terapia anticancerosa); (ix) prever la predicción y la detección temprana del tipo de tumor y la estadificación; (x) proporcionar la selección de terapia; y (xi) determinar si un tumor es metastásico o no.

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos a color previa solicitud. Las anteriores y otras

características y ventajas de la presente invención se comprenderán más completamente a partir de la siguiente descripción detallada de las realizaciones ilustrativas tomadas junto con los dibujos adjuntos en los que:

- 5 La Figura 1 representa esquemáticamente una ruta propuesta que conduce a la adquisición de ADN, ARN y/o distintivos de proteínas específicos de tumores por fagocitos después de la captura de CTC vivas, CTC apoptóticas, CTC fragmentadas, ADN tumoral, ARN y proteínas liberadas por células viables y/o tumorales apoptóticas. Téngase en cuenta que solo las células fagocíticas (y no las células no fagocíticas) adquieren distintivos tumorales.
- La Figura 2 representa esquemáticamente un método analítico *in vitro* utilizado en la identificación de distintivos de cáncer expresadas en/por células fagocíticas de pacientes con cáncer de ovario (OC).
- 10 La Figura 3 representa esquemáticamente un diagrama de flujo general de una realización de un método *in vitro* de la invención.
- La Figura 4 representa esquemáticamente una ruta propuesta que conduce a la adquisición de ADN, ARN y distintivos de proteínas específicos de tumores por fagocitos sanguíneos después de la absorción de CTC vivas, CTC apoptóticas, CTC fragmentadas, ADN tumoral, ARN y proteínas liberadas por células viables y/o tumorales apoptóticas. Tenga en cuenta que el contenido de ADN de los fagocitos después de la fagocitosis es $>2n$.
- 15 La Figura 5 representa esquemáticamente enfoques analíticos utilizados en la identificación de distintivos de cáncer de mama (BC) en animales portadores de BC.
- La Figura 6 representa esquemáticamente un diagrama de flujo general de otra realización de un método *in vitro* de la invención.
- La Figura 7 representa el análisis de electroforesis en gel de ARN total aislado de células LNCaP y LLC1.
- 20 La Figura 8 enumera el rendimiento y la calidad del ARN obtenido a partir de glóbulos blancos de ratón (glóbulos blancos).
- Las Figuras 9A-9D representan matrices que muestran siete genes relacionados con el cáncer regulados por incremento (>2 veces) detectados en neutrófilos de ratones desnudos portadores de tumores LNCaP (cáncer de próstata humano). (A) tumor LNCaP. (B) Neutrófilos obtenidos de ratones desnudos portadores de tumores LNCaP (N_T). (C) Células T obtenidas de ratones desnudos portadores de tumores LNCaP (T_T). (D) Neutrófilos obtenidos de ratones desnudos que no portan tumores (N_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en neutrófilos de ratones portadores de tumores (B) y expresados mínimamente en neutrófilos de ratones que no tienen tumores (D) y en células T no fagocíticas (C). La expresión en N_T fue >2 veces mayor que en N_N y T_T .
- 25 Las Figuras 10A-10D representan matrices que muestran tres genes regulados por aumento, relacionados con el cáncer, detectados en macrófagos de ratones desnudos portadores de tumores LNCaP (cáncer de próstata humano). (A) tumor LNCaP. (B) macrófagos obtenidos de ratones desnudos portadores de tumores LNCaP (M_T). (C) Células T obtenidas de ratones desnudos portadores de tumores LNCaP (T_T). (D) macrófagos obtenidos de ratones desnudos que no portan tumores (M_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en macrófagos de ratones portadores de tumores (B), y expresados mínimamente en macrófagos de ratones que no tienen tumores (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión en M_T fue >2 veces mayor que en M_N y T_T .
- 30 Las Figuras UA-UD representan matrices que muestran cuatro genes relacionados con el cáncer regulados por incremento (>2 veces) detectados en neutrófilos de ratones desnudos portadores de tumores LS174T (cáncer de colon humano). (A) tumor LS174T. (B) Neutrófilos obtenidos de ratones desnudos portadores de tumores LS174T (N_T). (C) Células T obtenidas de ratones desnudos que portan tumores LS174T (T_T). (D) Neutrófilos obtenidos de ratones desnudos que no llevan tumores (N_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en neutrófilos de ratones portadores de tumores (B), y expresadas mínimamente en neutrófilos de ratones que no tienen tumores (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión fue N_T es >2 veces mayor que en N_N y T_T .
- 35 Las Figuras 12A-12D representan matrices que muestran tres genes regulados por incremento (>2 veces), relacionados con el cáncer, detectados en macrófagos de ratones desnudos portadores de tumores LS174T (cáncer de colon humano). (A) tumor LS174T. (B) Macrófagos obtenidos de ratones desnudos portadores de tumores LS174T (M_T). (C) Células T obtenidas de ratones desnudos que portan tumores LS174T (T_T). (D) Macrófagos obtenidos a partir de ratones desnudos sin tumores (M_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en macrófagos de ratones portadores de tumores (B), y expresadas mínimamente en macrófagos de ratones que no tienen tumor (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión en M_T es >2 veces mayor que en M_N y T_T .
- 45 Las Figuras 13A-13D representan matrices que muestran cinco genes relacionados con cáncer regulados por incremento (>2 veces) detectados en neutrófilos de ratones C57/B1 portadores de tumores LLC1 (cáncer de pulmón metastásico de ratón). (A) tumor LLC1. (B) Neutrófilos obtenidos de ratones C57/B1 con tumores LLC1 (N_T). (C) Células T obtenidas de ratones C57/B1 que portan tumores LLC1 (T_T). (D) Neutrófilos obtenidos de ratones C57/B1 sin tumores (N_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en neutrófilos de ratones portadores
- 50

de tumores (B), y expresadas mínimamente en neutrófilos de ratones que no tienen tumores (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión en N_T fue >2 veces mayor que en N_N y T_T .

5 Las Figuras 14A-14D representan matrices que muestran dos genes relacionados con el cáncer regulados por incremento (>2 veces) detectados en macrófagos de ratones C57/B1 portadores de tumores LLC1 (cáncer de pulmón metastásico de ratón). (A) tumor LLC1. (B) Macrófagos obtenidos de ratones C57/B1 que portan tumores LLC1 (M_T). (C) Células T obtenidas de ratones C57/B1 que portan tumores LLC1 (T_T). (D) Macrófagos obtenidos de ratones C57/B1 sin tumores (M_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en neutrófilos de ratones portadores de tumores (B), y expresadas mínimamente en neutrófilos de ratones que no tienen tumores (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión en M_T fue >2 veces mayor que en M_N y T_T .

10 Las Figuras 15A-15D representan matrices que muestran dos genes regulados por incremento (>2 veces), relacionados con el cáncer, detectados en neutrófilos de tumor BI 6F10 (melanoma metastásico de ratón) que lleva ratones C57/B1. (A) tumor BI 6F10. (B) Neutrófilos obtenidos de ratones C57/B1 que llevan tumores BI 6F10 (N_T). (C) Células T obtenidas de ratones C57/B1 que portan tumores BI 6F10 (T_T). (D) Neutrófilos obtenidos de ratones C57/B1 sin tumores (N_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en neutrófilos de ratones portadores de tumores (B), y expresadas mínimamente en neutrófilos de ratones que no tienen tumores (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión en N_T fue >2 veces mayor que en N_N y T_T .

20 Las Figuras 16A-16D representan matrices que muestran un gen regulado por incremento (>2 veces), relacionado con el cáncer, detectado en macrófagos de ratones C57/B1 con tumor BI 6F10 (melanoma metastásico de ratón). (A) tumor BI 6F10. (B) Macrófagos obtenidos de ratones C57/B1 que llevan tumores BI 6F10 (M_T). (C) Células T obtenidas de ratones C57/B1 que portan tumores BI 6F10 (T_T). (D) macrófagos obtenidos de ratones C57/B1 que no portan tumores (M_N). Distintivos en círculos expresados en células tumorales (A) y en macrófagos de ratones portadores de tumores (B), y expresadas mínimamente en macrófagos de células no tumorales teniendo ratones (D), y en células T no fagocíticas (C). La expresión en M_T fue >2 veces mayor que en M_N y T_T .

25 Las Figuras 17A-17D representan matrices que muestran cinco genes regulados por incremento (>2 veces), relacionados con el cáncer, detectados en neutrófilos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello (carcinoma de células escamosas). (A) biopsia de tejido normal (piel). (B) Biopsia de tejido tumoral. (C) Neutrófilos obtenidos de sangre del paciente (N_T). (D) células T obtenidas de la sangre del paciente (T_T). Distintivos en círculos expresadas en células tumorales (B) y en neutrófilos de sangre del paciente (C), y mínimamente expresadas o no expresadas en piel normal (A) o células T no fagocíticas (D). La expresión en N_T fue >2 veces mayor que en T_T y piel.

30 Las Figuras 18A-18D representan matrices que muestran 23 genes regulados por aumento (>2 veces), relacionados con el cáncer, detectados en macrófagos de pacientes con cáncer de ovario (adenocarcinoma). (A) Macrófagos obtenidos de sangre del paciente (M_T). (B) Células T obtenidas de sangre del paciente (T_T). Distintivos en círculos expresadas en macrófagos del paciente (A) y mínimamente expresadas en células T no fagocíticas (B). La expresión en M_T fue >2 veces mayor que en T_T .

35 La Figura 19 representa un método *in vitro* usado para identificar distintivos tumorales en células fagocíticas. En este ejemplo, se cuantificaron las intensidades de expresión de genes asociados al cáncer en macrófagos de animales portadores de tumores (M_T) en comparación con los de células T de los mismos animales (T_T) y aquellos sobreexpresados por >2 veces identificados. A continuación, se cuantificaron las intensidades de todos los genes expresados en M_T y se compararon con las de los macrófagos obtenidos de animales que no tenían tumores (M_{NT}) y se identificaron los genes sobreexpresados >2 veces. Los genes comunes a ambas listas se seleccionaron y se compararon con los expresados por el mismo tumor (área sombreada).

45 Las Figuras 20A-20B representan comparaciones de intensidad de expresión génica en (A) macrófagos obtenidos de ratones desnudos portadores de tumores de próstata humana LNCaP (M_{LNCaP}) y células T de los mismos animales (células T_{LNCaP}), (B) M_{LNCaP} y macrófagos obtenidos de tumores no tumorales teniendo ratones (M_{non_tumor}), (C) neutrófilos obtenidos de ratones desnudos portadores de tumores de próstata humanos LNCaP (N_{LNCaP}) y células T de los mismos animales (células T_{LNCaP}), y (D) N_{LNCaP} y macrófagos obtenidos de ratones que no tienen tumores (N_{non_tumor}). Los genes en rojo fueron sobreexpresados >2 veces; aquellos en verde fueron subexpresados >2 veces.

50 La Figura 21 enumera la expresión de genes relacionados con el cáncer dentro de neutrófilos fagocíticos (N) y macrófagos (M).

La Figura 22 enumera los genes relacionados con el cáncer sobrerregulados (>2 veces) en los macrófagos fagocíticos de un paciente con cáncer de ovario en comparación con las células T no fagocíticas.

La Figura 23 representa la electroforesis en gel de SDS (10%) de muestra de proteína (5.9 μ g) obtenida de glóbulos blancos de ratón.

55 La Figura 24 representa el análisis de inmunotransferencia Western de expresión de TAG-72 y PSA en células T y monocitos/macrófagos (M/M) obtenidos a partir de ratones portadores de tumores, que ilustra la presencia de distintivos en células fagocíticas solamente.

Descripción detallada de ciertas realizaciones

Las realizaciones de la presente invención se refieren a un método *in vitro* para proporcionar un perfil de expresión específico del paciente de marcadores asociados con el cáncer en función del contenido celular y/o los perfiles de expresión de las células fagocíticas. De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los contenidos celulares y/o los perfiles de expresión de células fagocíticas se comparan con marcadores conocidos para un estado o condición de enfermedad particular para detectar y/o diagnosticar el estado o la condición de enfermedad particular. De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, el contenido celular y/o el perfil de expresión de las células fagocíticas se compara con el contenido celular y/o el perfil de expresión de las células no fagocíticas de la sangre de un solo paciente. Al sustraer el contenido celular y/o el perfil de expresión de las células no fagocíticas del de las células fagocíticas, se crea un perfil celular y/o un perfil de expresión representativo solo del estado de enfermedad del individuo.

De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, se obtiene una población de células fagocíticas de un individuo y se compara el contenido celular y/o perfil de expresión de células fagocíticas de la población donde el contenido de ADN es mayor que $2n$ en comparación con el contenido celular y/o perfil de expresión de células fagocíticas de la misma población donde el contenido de ADN es $2n$. Según una realización aún adicional de la presente invención, se obtiene una población de células fagocíticas de un individuo y el perfil de expresión de células fagocíticas de la población en la que el contenido de ARN y/o proteína es mayor de lo normal y tiene un índice de ADN mayor que 1 se compara con el perfil de expresión de células fagocíticas de la misma población donde el contenido de ARN y/o proteína es normal y/o tiene un índice de ADN de 1.

Dicho perfil de expresión específico del paciente elimina la dependencia de un perfil de distintivo promedio derivado de la población para un cáncer particular, que puede introducir un error en la detección o el diagnóstico de un cáncer particular en el individuo. Tal perfil de expresión específico del paciente para un estado de cáncer de la presente invención permite que la detección, el diagnóstico y el tratamiento se personalicen al individuo.

Con referencia a las Figuras 1-3 y de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, se compararon los perfiles de expresión génica de glóbulos blancos fagocíticos y no fagocíticos obtenidos a partir de ratones portadores de tumores subcutáneos (s.c.) humanos antiguos de aproximadamente tres semanas (adenocarcinoma de próstata LNCaP o adenocarcinoma de colon LS174T) o tumores de ratón (melanoma BI 6F10 metastásico, administrado por vía intravenosa, o cáncer de pulmón LLC1, inyectado s.c.). Los resultados demostraron que los neutrófilos y macrófagos obtenidos a partir de estos ratones portadores de tumores expresan diversos oncogenes y otros distintivos génicos relacionados con el cáncer que también se expresan en cada uno de los respectivos tumores. Véanse Figuras 9-16 y 19-21. Estos genes y oncogenes relacionados con el cáncer (por ejemplo, ERBB2, Jun, Fos, etc.) no son expresados o son expresados mínimamente por (i) células T no fagocíticas aisladas de ratones portadores de tumores, y (ii) neutrófilos y macrófagos obtenidos de ratones sin tumores. Además, se descubrió que solo las células fagocíticas de ratones portadores de tumores expresaban proteínas específicas de tumores. Véanse las Figuras 23 y 24. Los CTC y/o el ADN y/o proteínas específicos de tumores en la sangre de los ratones fagocitados y parte del ADN de las células tumorales, con sus mutaciones y genes específicos del tumor, se integró, probablemente por transfección (sin pretender imponer ninguna teoría), en el ADN fagocitario normal, transcrito en ARN y traducido en proteína.

Con referencia a las Figuras 1-3 y de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo de la presente invención, también se compararon los perfiles de expresión génica de glóbulos blancos fagocíticos y no fagocíticos obtenidos de pacientes con tumores de cabeza y cuello o con cáncer de ovario. Los resultados demostraron que los neutrófilos y macrófagos obtenidos de estos pacientes expresan diversos oncogenes y otros distintivos genéticos relacionados con el cáncer que también se expresan en cada uno de los respectivos tumores. Véanse las Figuras 17-18 y 22. Estos genes y oncogenes relacionados con el cáncer no fueron expresados o fueron expresados mínimamente por células T no fagocíticas aisladas del mismo paciente individual. Los CTC y/o ADN y ARN específicos de tumores en la sangre del paciente fueron fagocitados y parte del ADN y/o ARN de células tumorales, con sus mutaciones y genes específicos del tumor, se integraron, probablemente mediante transfección (sin pretender imponer ninguna teoría), en el ADN de fagocito normal, transcrito en ARN, y traducido en proteína.

Con referencia a las Figuras 4-6 y de acuerdo con ciertas realizaciones de ejemplo, se obtiene el análisis cuantitativo de ADN (nuclear y/o mitocondrial), ARN, microARN, y/o proteína, perfiles de expresión de células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos) a partir de sangre o una o más muestras biológicas (por ejemplo, orina, heces, saliva, linfa, líquido cefalorraquídeo y similares) cuyo (1) contenido de ADN es $>2n$ ($P_n > 2$), o (2) ARN, y/o el contenido de proteína es mayor de lo normal, es decir, células que han fagocitado CTC y/o sus fragmentos subcelulares o ADN/ARN/lípidos (es decir, distintivos específicos de tumores) y/o tienen un índice de ADN mayor que uno, y su comparación con la misma población de células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos) cuyo (1) contenido de ADN es $2n$ ($P_n = 2$), o (2) ARN, y/o contenido de proteína es normal, es decir, células que no han fagocitado CTC y/o su fragmentos subcelulares y tienen un índice de ADN de uno, proporciona un método *in vitro* para detectar distintivos específicos de tumor dentro de las células $P_n > 2$ (p señal específica del paciente) que no son expresados o son expresados mínimamente en las células $P_n = 2$ (ruido específico del paciente). Con referencia a la Figura 6, la sustracción del ADN, ARN y/o proteína, perfiles de $P_n = 2$ de aquellos de $P_n > 2$ como se muestra en la Figura 5, proporciona un método *in vitro* para identificar (por ejemplo, después de uno o más análisis genómicos, proteómicos,

metabolómicos, glicoproteómicos y/o lipoproteómicos) distintivos específicos de tumor en una muestra de sangre (o una o más muestras biológicas como, por ejemplo, otros fluidos corporales) de un animal y/o un humano con cáncer y significan la presencia de tumores ocultos. A diferencia de los métodos *in vitro* descritos anteriormente en los que los perfiles genómico, proteómico, metabolómico, glicoproteómico y/o lipoproteómico de las células fagocíticas se comparan con los de las células no fagocíticas, las principales ventajas de este método de detección analítica de acuerdo con la presente invención son: (i) utiliza una sola subpoblación de células fagocíticas como fuente de los distintivos "específicos de tumor" (por ejemplo, macrófagos $P_{n>2}$) y "normales no específicos" (por ejemplo, macrófagos $P_{n=2}$), es decir, ambos comparten el mismo genotipo de referencia; y (ii) las células que adquieren el distintivo (por ejemplo, neutrófilos $P_{n>2}$) no se diluyen con las que no han fagocitado, y por lo tanto no han adquirido, CTC muertas y/o fragmentos de las mismas (por ejemplo, neutrófilos $P_{n=2}$).

Con referencia a las Figuras 4-6 y de acuerdo con ciertas realizaciones a modo de ejemplo, el análisis cuantitativo de células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos) obtenido de la sangre o una o más muestras biológicas o fluidos corporales (por ejemplo, orina, heces, saliva, linfa, líquido cefalorraquídeo y similares) cuyo contenido intracelular como consecuencia de la fagocitosis o internalización de otras células vivas, moribundas o muertas (por ejemplo, apoptóticas o necróticas), cuerpos apoptóticos, núcleos, microvesículas, exosomas, nucleosomas, mitocondrias, retículo endoplásmico y similares, es mayor que la de la misma población de células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos) con contenido intracelular normal (P_{NIC}), es decir, células que no han fagocitado ninguna de las células mencionadas anteriormente y/o restos celulares (ruido específico del paciente), proporciona una método *in vitro* para detectar los distintivos específicos de tumor dentro de los fagocitos con un contenido intracelular incrementado (P_{TIC}) que no se expresan o se expresan mínimamente en los fagocitos con un contenido intracelular orgánico (ruido específico del paciente). Con referencia a la Figura 6, la sustracción de ADN, ARN y/o proteína, perfiles de P_{NIC} de los de P_{TIC} como se muestra en la Figura 5 proporciona un método *in vitro* para identificar (por ejemplo, después de uno o más análisis genómico, proteómico, metabolómico, glicoproteómico y/o lipoproteómico) distintivos específicos de tumor en una muestra de sangre (o una o más muestras biológicas tales como, por ejemplo, otros fluidos corporales) de un animal con cáncer y que indican la presencia de tumores ocultos. A diferencia de los métodos *in vitro* descritos anteriormente en los que los perfiles genómico, proteómico, metabolómico, glicoproteómico y/o lipoproteómico de las células fagocíticas se comparan con los de las células no fagocíticas, las principales ventajas de este método de detección analítica de acuerdo con la presente invención son: (i) utiliza una única subpoblación de células fagocíticas como fuente de los distintivos "específicos de la enfermedad" (por ejemplo, macrófago P_{TIC}) y "normales no específicos" (por ejemplo, macrófago P_{NIC}), es decir, ambos comparten la misma línea base genotipo; y (ii) las células que adquieren el distintivo (por ejemplo, neutrófilos P_{TIC}) no se diluyen con las que no han fagocitado, y por lo tanto no han adquirido, CTC muertas y/o fragmentos de las mismas (por ejemplo, neutrófilos P_{NIC}).

Los métodos *in vitro* descritos en el presente documento (i) tienen alta especificidad, sensibilidad y precisión y deberían permitir la detección de distintivos específicos de tumor y normales no específicos presentes en una muestra de sangre (u otra muestra biológica tal como, por ejemplo, un fluido corporal); y (ii) eliminan la "desigualdad de línea base" que se sabe que ocurre entre individuos debido variaciones a intrínsecas y temporales (por ejemplo, edad, género, origen étnico, estado de salud y similares) en la expresión génica. Por consiguiente, en ciertos aspectos, la invención proporciona ensayos no invasivos para la detección temprana de tumores primarios y metastásicos ocultos en pacientes, es decir, antes de que la enfermedad pueda diagnosticarse mediante técnicas de imagen convencionales (por ejemplo, PET, MRI, CT y similares) y, por lo tanto, proporcionar una base para una mejor toma de decisiones en relación con las necesidades y estrategias de intervención, prevención y tratamiento de las personas con cáncer.

Como se usa en este documento, la expresión "marcador específico de tumor" pretende incluir, pero no se limita a, uno o más componentes celulares tales como una o más secuencias de ADN, una o más secuencias de ARN, una o más proteínas, uno o más polipéptidos, y similares. En ciertos aspectos, un marcador específico de tumor está presente en uno o más glóbulos blancos tales como, por ejemplo, un neutrófilo, un macrófago y/o una célula dendrítica.

Como se usa en el presente documento, el término "genes relacionados con cáncer" se refiere a genes tales como, por ejemplo, genes de cáncer, oncogenes y/o genes supresores de tumor que tienen expresión alterada (por ejemplo, expresión aumentada o expresión disminuida en comparación con una célula no cancerosa) en una célula cancerosa (por ejemplo, un glóbulo blanco tal como, por ejemplo, un macrófago, un neutrófilo, una célula T o similar). Muchos genes relacionados con el cáncer son conocidos en la técnica. Los genes relacionados con el cáncer incluyen, por ejemplo, pero no están limitados a ERBB 2, JUN, RBI, SUPPI, MDM2, MAP2K1, MMP2, PDGFB, PLAUR, FGR, MYCLI, BLYM, NRASI, PEI, SKI, TRK, ABL2, MYCN, RABI, REL, RALB, LCO, ERBB4, RAFI, ECT2, KIT, FGF5, GRO1, GRO2, GRO3, FMS, PIM, KRASIP, FYN, MYB, ROSI, MASI, RALA, MYCLKI, GLB, ARAF2, MET, BRAF, MOS, LYN, MYBLI, MYC, OVC, VAV2, BMII, RET, HRAS, SPII, RELA, SEA, EMSI, ETSI, KRAS2, ERBB3, GLI, FLT, BRCA2, RBI, FOS, AKTI, ELK2, FES, MAF, TP53, CRK, ERBAI, NFI, EVI2, ERBBB2, INT4, BRCAI, YESI, JUND, JUNB, MEL, LPSA, VAVI, AKT2, FOSB, RRAS, HKRI, HKR2, ERBAL2, SRC, MYBL2, ETS2, ERG, ARAFI, YUASA, HS2, INT3, SNO, RMYC, BMYC, HRASP, TC21, TIM, PTI-I, JAK, uno o miembros de la familia CEA (véase, por ejemplo, Zhou et al. (2001) Gene 264:105), PSA, MUC- 16 y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a diversos tipos de neoplasmas malignos, la mayoría de los cuales puede invadir tejidos circundantes, y puede hacer metástasis en diferentes sitios (véase, por ejemplo, PDR Medical Dictionary, 1ª edición (1995)). Los términos "neoplasia" y "tumor" se refieren a un tejido anormal que crece por proliferación celular más rápidamente de lo normal y continúa creciendo después de que se eliminan los estímulos que iniciaron la proliferación. Id. Tal tejido anormal muestra una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal que puede ser benigno (es decir, tumor benigno) o maligno (es decir, tumor maligno).

Ejemplos de categorías generales de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinomas (es decir, tumores malignos derivados de células epiteliales tales como, por ejemplo, formas comunes de cáncer de mama, próstata, pulmón y colon), sarcomas (es decir, tumores malignos derivados del tejido conectivo o células mesenquimales), linfomas (es decir, neoplasias derivadas de células hematopoyéticas), leucemias (es decir, tumores malignos derivados de células hematopoyéticas), tumores de células germinales (es decir, tumores derivados de células totipotentes. En adultos se encuentran con mayor frecuencia en el testículo u ovario; en fetos, bebés y niños pequeños, se encuentran con mayor frecuencia en la línea media del cuerpo, particularmente en la punta del coxis), tumores blásticos (es decir, un tumor típicamente maligno que se asemeja a un tejido inmaduro o embrionario) y similares.

Ejemplos de los tipos de neoplasmas que se pretende abarcar mediante la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los neoplasmas asociados con cánceres de tejido neural, tejido formador de sangre, mama, piel, hueso, próstata, ovarios, útero, cuello uterino, hígado, pulmón, cerebro, laringe, vesícula biliar, páncreas, recto, paratiroides, tiroides, glándula suprarrenal, sistema inmunitario, cabeza y cuello, colon, estómago, bronquios y/o riñones.

Como se usa en el presente documento, el término "organismo" incluye, pero no se limita a, un individuo humano, un primate no humano, una vaca, un caballo, una oveja, una cabra, un cerdo, un perro, un gato, un conejo, un ratón, una rata, un jirafa, una rana, un sapo y una especie transgénica de los mismos.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, se proporcionan métodos *in vitro* para detectar marcadores tales como secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN y similares), proteínas, polipéptidos y similares en una muestra biológica. Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" pretende incluir moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos del ADN o ARN generado usando análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble.

Como se usa en este documento, el término "aminoácido" incluye compuestos orgánicos que contienen tanto un grupo amino básico como un grupo carboxilo ácido. Se incluyen dentro de este término los aminoácidos naturales (por ejemplo, L-aminoácidos), aminoácidos modificados e inusuales (por ejemplo, D-aminoácidos y β -aminoácidos), así como aminoácidos que se sabe que se producen biológicamente en forma libre o forma combinada, pero generalmente no se encuentran en las proteínas. Los aminoácidos naturales que producen proteínas incluyen alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina, triptófano, prolina y valina. Los aminoácidos naturales no proteicos incluyen ácido arginosuccínico, citrulina, ácido sulfúrico cisteína, 3,4-dihidroxifenilalanina, homocisteína, homoserina, ornitina, 3-monoyodotirosina, 3,5-diiodotirosina, 3,5,5-triiodotironina y 3,3',5,5'-tetrayodotironina. Los aminoácidos modificados o inusuales incluyen D-aminoácidos, hidroxilisina, 4-hidroxi prolina, aminoácidos N-Cbz-protectados, ácido 2,4-diaminobutírico, homoarginina, norleucina, ácido N-metilaminobutírico, naftilalanina, fenilglicina, α -fenilprolina, tert-leucina, 4-aminociclohexilalanina, N-metil-norleucina, 3,4-dehidroprolina, N,N-dimetilaminoglicina, N-metilaminoglicina, ácido 4-aminopiperidina-4-carboxílico, ácido 6-aminocaproico, trans-4-(ácido aminometil)-ciclohexanocarboxílico, ácido 2-, 3- y 4-(aminometil)-benzoico, ácido 1-aminociclopentanocarboxílico, ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y ácido 2-bencil-5-aminopentanoico.

Como se usa en este documento, el término "péptido" incluye compuestos que consisten en dos o más aminoácidos que están unidos por medio de un enlace peptídico. Los péptidos pueden tener un peso molecular de menos de 10000 Daltons, menos de 5000 Daltons, o menos de 2500 Daltons. El término "péptido" también incluye compuestos que contienen tanto componentes peptídicos como no peptídicos, tales como residuos pseudopeptídicos o peptidomiméticos u otros componentes no aminoácidos. Dichos compuestos que contienen componentes tanto peptídicos como no peptídicos también pueden denominarse "análogo peptídico".

Como se usa en el presente documento, el término "proteína" incluye compuestos que consisten en aminoácidos dispuestos en una cadena lineal y unidos entre sí por enlaces peptídicos entre los grupos carboxilo y amino de residuos de aminoácidos adyacentes.

Un método de ejemplo *in vitro* para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido o ácido nucleico correspondiente a un marcador de la invención en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de fluido corporal (por ejemplo, sangre) y/o muestra tumoral) de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar uno o más marcadores (por ejemplo, ADN, ARN, proteína, polipéptido o similares).

Los métodos de detección descritos en este documento pueden usarse para detectar uno o más marcadores (por ejemplo, ADN, ARN, proteína, polipéptido o similares) en una muestra biológica *in vitro*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico incluyen hibridaciones Southern.

Los métodos para analizar el contenido de lípidos en una muestra biológica se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Kang et al., (1992) *Biochim. Biophys. Acta.* 1128: 267; Weylandt et al., (1996) *Lipids* 31: 977. J. Schiller et al. (1999) *Anal. Biochem.* 267: 46; Kang et al (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4050; Schiller et al. (2004) *Prog. Lipid Res.* 43: 499).

Un principio general de ensayos de diagnóstico y pronóstico implica preparar una muestra o mezcla de reacción que puede contener un marcador (por ejemplo, uno o más de ADN, ARN, proteína, polipéptido y similares) y una sonda en condiciones apropiadas y para un tiempo suficiente para permitir que el marcador y la sonda interactúen y se unan, formando así un complejo que puede eliminarse y/o detectarse en la mezcla de reacción. Estos ensayos pueden realizarse de varias formas.

Por ejemplo, un método *in vitro* para llevar a cabo tal ensayo implicaría anclar el marcador o sonda sobre un soporte en fase sólida, también denominado sustrato, y detectar complejos marcador/sonda diana anclados en la fase sólida al final de la reacción. En una realización de dicho método *in vitro*, se puede anclar una muestra de un sujeto, que se va a ensayar para determinar la presencia y/o concentración del marcador, sobre un vehículo o soporte de fase sólida. En otra realización, es posible la situación inversa, en la que la sonda se puede anclar a una fase sólida y se puede dejar que una muestra de un sujeto reaccione como un componente no anclado del ensayo. [102] Hay muchos métodos establecidos para anclar componentes de ensayo a una fase sólida. Estos incluyen, sin limitación, moléculas marcadoras o de sonda que se inmovilizan mediante la conjugación de biotina y estreptavidina. Dichos componentes de ensayo biotinilados se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, IL), e inmovilizados en los pozos de placas de 96 pozos recubiertas con estreptavidina (Pierce Chemical). En ciertas realizaciones, las superficies con componentes de ensayo inmovilizados se pueden preparar de antemano y almacenar.

Otros vehículos adecuados o soportes de fase sólida para tales ensayos incluyen cualquier material capaz de unirse a la clase de molécula a la que pertenece el marcador o sonda. Los soportes o vehículos bien conocidos incluyen, entre otros, vidrio, poliestireno, nylon, polipropileno, nylon, polietileno, dextrano, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, gabros y magnetita.

Para realizar ensayos con las metodologías mencionadas anteriormente, el componente no inmovilizado se agrega a la fase sólida sobre la cual se ancla el segundo componente. Después de que se completa la reacción, los componentes no complejados pueden eliminarse (por ejemplo, mediante lavado) en condiciones tales que cualquier complejo formado permanecerá inmovilizado sobre la fase sólida. La detección de complejos marcador/sonda anclados a la fase sólida se puede llevar a cabo en una serie de métodos descritos en este documento.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, la sonda, cuando es el componente de ensayo sin anclaje, puede marcarse con el fin de detectar y leer el ensayo, directa o indirectamente, con marcadores detectables descritos en este documento y que son bien conocidos por un experto en la técnica.

También es posible detectar directamente la formación del complejo marcador/sonda sin más manipulación o marcaje de ninguno de los componentes (marcador o sonda), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,631,169 y 4,868,103). Una etiqueta de fluoróforo en la primera molécula "donante" se selecciona de modo que, tras la excitación con luz incidente de longitud de onda apropiada, su energía fluorescente emitida será absorbida por una etiqueta fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez puede fluorescer debido a la energía absorbida. Alternativamente, la molécula de proteína "donante" puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de los residuos de triptófano. Se eligen etiquetas que emiten diferentes longitudes de onda de luz, de modo que la etiqueta de la molécula "aceptora" se puede diferenciar de la del "donante". Dado que la eficiencia de la transferencia de energía entre las etiquetas está relacionada con la distancia que separa las moléculas, se pueden evaluar las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en la que se produce la unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la etiqueta de la molécula "aceptora" en el ensayo debe ser máxima. Un evento de unión a FET se puede medir convenientemente a través de medios de detección fluorométricos convencionales bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un fluorímetro).

En otra realización, la determinación de la capacidad de una sonda para reconocer un marcador puede lograrse sin etiquetar ninguno de los componentes del ensayo (sonda o marcador) utilizando una tecnología tal como el análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) (véase, por ejemplo, Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, *Anal. Chem.* 63: 2338 2345 and Szabo et al., 1995, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 699 705). Como se usa en el presente documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIAcore). Los cambios en la masa en la

superficie de unión (indicativos de un evento de unión) dan como resultado alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de la resonancia de plasmón superficial (SPR)), dando como resultado una señal detectable que puede usarse como una indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

5 Alternativamente, en otra realización, se pueden realizar ensayos de diagnóstico y pronóstico análogos con marcador y sonda como solutos en una fase líquida. En tal ensayo, el marcador complejado y la sonda se separan de los componentes no complejados por cualquiera de una serie de técnicas estándar, que incluyen, pero no se limitan a: centrifugación diferencial, cromatografía, electroforesis e inmunoprecipitación. En la centrifugación
10 diferencial, los complejos marcador/sonda pueden separarse de los componentes de ensayo no complejados a través de una serie de etapas centrífugas, debido a los diferentes equilibrios de sedimentación de los complejos en función de sus diferentes tamaños y densidades (véase, por ejemplo, Rivas and Minton (1993). *Biochem. Sci.* 18: 284). Las técnicas cromatográficas estándar también se pueden utilizar para separar moléculas complejadas de las no complejadas. Por ejemplo, la cromatografía de filtración en gel separa las moléculas en función del tamaño, y mediante la utilización de una resina de filtración en gel apropiada en un formato de columna, por ejemplo, el
15 complejo relativamente más grande puede separarse de los componentes no complejos relativamente más pequeños. De forma similar, las propiedades de carga relativamente diferentes del complejo marcador/sonda en comparación con los componentes no complejados se pueden explotar para diferenciar el complejo de los componentes no complejados, por ejemplo mediante la utilización de resinas de cromatografía de intercambio iónico. Tales resinas y técnicas cromatográficas son bien conocidas por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Heegaard (1998) *J. Mol. Recognit.* 11:141; Hage and Tweed (1997) *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl* 12: 499). La electroforesis en gel también puede emplearse para separar componentes de ensayo complejados de componentes
20 no unidos (véase, por ejemplo, Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1987 1999). En esta técnica, los complejos de proteína o ácido nucleico se separan en función del tamaño o la carga, por ejemplo. Con el fin de mantener la interacción de unión durante el proceso electroforético, típicamente se prefieren materiales y condiciones de matriz de gel no desnaturizantes en ausencia de agente reductor. El experto en la técnica conocerá las condiciones apropiadas para el ensayo particular y los componentes del mismo.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, el nivel de ARNm correspondiente al marcador se puede determinar mediante formatos *in situ* y/o *in vitro* en una muestra biológica usando métodos *in vitro* conocidos en la técnica. Muchos métodos de detección de expresiones usan ARN aislado. Para métodos *in vitro*, cualquier técnica de
30 aislamiento de ARN que no seleccione contra el aislamiento de ARNm se puede utilizar para la purificación de ARN de células sanguíneas (véase, por ejemplo, Ausubel et al, ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York 1987 1999). Adicionalmente, se pueden procesar fácilmente grandes cantidades de células y/o muestras usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el proceso de aislamiento de ARN en una sola etapa de Chomczynski (1989, Patente de los Estados Unidos No. 4,843,155).

35 El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis Southern o Northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa y matrices de sondas. En ciertas realizaciones de ejemplo, un método de diagnóstico *in vitro* para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm codificado por el gen que se está detectando. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADNc de longitud completa, o una
40 porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 7, 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente bajo condiciones rigurosas para un ARNm o ADN genómico que codifica un marcador de la presente invención. En este documento se describen otras sondas adecuadas para uso en los ensayos de diagnóstico de la invención. La hibridación de un ARNm con la sonda indica que el marcador en cuestión se está expresando.

45 En un formato, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo haciendo funcionar el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En un formato alternativo, las sondas se inmovilizan en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, en un conjunto de chips de genes. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de ARNm conocidos para usar en la detección del nivel de ARNm codificado por
50 los marcadores de la presente invención.

Un método alternativo *in vitro* para determinar el nivel de ARNm correspondiente a un marcador de la presente invención en una muestra implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante rPCR (la realización experimental expuesta en las Patentes de los Estados Unidos No. 4,683,195 y 4,683,202). COLD-PCR (Li et al. (2008) *Nat. Med.* 14: 579), reacción en cadena de la ligasa (Barany, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 189), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874), sistema de
55 amplificación transcripcional (Kwoh et al (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173), Q- Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) *Bio/Technology* 6: 1197), replicación de círculo rodante (Patente de Estados Unidos No. 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente
60 útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. Como se usa en el presente documento, los cebadores de amplificación se definen como un par de moléculas de ácido nucleico que pueden reasociarse a regiones 5' o 3' de un gen (cadenas más y menos, respectivamente, o

viceversa) y contienen una región corta entre ellas. En general, los cebadores de amplificación tienen una longitud de aproximadamente 10 a 30 nucleótidos y flanquean una región de aproximadamente 50 a 200 nucleótidos de longitud. En condiciones apropiadas y con los reactivos apropiados, dichos cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

5 Para los métodos *in situ*, el ARNm no necesita ser aislado de la muestra (por ejemplo, un fluido corporal (por ejemplo, células sanguíneas)) antes de la detección. En dichos métodos, se prepara/procesa una muestra de células o tejidos usando métodos histológicos conocidos. La muestra se inmoviliza luego sobre un soporte, típicamente un portaobjetos de vidrio, y luego se pone en contacto con una sonda que puede hibridarse con el ARNm que codifica el marcador.

10 Como una alternativa para hacer determinaciones basadas en el nivel de expresión absoluta del marcador, las determinaciones pueden basarse en el nivel de expresión normalizado del marcador. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluta de un marcador comparando su expresión con la expresión de un gen que no es un marcador, por ejemplo, un gen constitutivo que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen genes de mantenimiento tales como el gen de actina o genes específicos de células epiteliales. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra de paciente de una fuente a una muestra de paciente de otra fuente, por ejemplo, para comparar una célula sanguínea fagocítica de un individuo a una célula sanguínea no fagocítica del individuo.

En otra realización a modo de ejemplo, se detecta una proteína o polipéptido correspondiente a un marcador. En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, un agente para detectar un polipéptido de la invención es un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido correspondiente a un marcador de la invención, tal como un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales, o más preferiblemente, monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar la marcación directa de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y la marcación final de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Se puede emplear una variedad de formatos para determinar si una muestra contiene una proteína que se une a un anticuerpo dado. Ejemplos de tales formatos incluyen, pero no se limitan a, inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA), análisis de transferencia Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y similares. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente métodos de detección de proteína/anticuerpo *in vitro* para usar en la determinación de si las células (por ejemplo, células de fluido corporal tales como células sanguíneas) expresan un marcador de la presente invención.

En un formato, los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, pueden usarse en métodos *in vitro* tales como transferencias Western o técnicas de inmunofluorescencia para detectar las proteínas expresadas. En tales usos, generalmente es preferible inmovilizar el anticuerpo o las proteínas en un soporte sólido. Los soportes o vehículos en fase sólida adecuados incluyen cualquier soporte capaz de unirse a un antígeno o a un anticuerpo. Soportes o vehículos bien conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros, magnetita y similares.

Un experto en la técnica conocerá muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpo o antígeno, y podrá adaptar dicho soporte para usar con la presente invención. Por ejemplo, la proteína aislada de las células (por ejemplo, células de fluido corporal tales como células sanguíneas) se puede ejecutar en una electroforesis en gel de poliácridamida y se puede inmovilizar sobre un soporte en fase sólida tal como nitrocelulosa. El soporte puede luego lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de forma detectable. El soporte de fase sólida se puede lavar con el regulador una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de etiqueta unida sobre el soporte sólido puede detectarse entonces por medios convencionales.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, se proporcionan ensayos de diagnóstico. Un método de ejemplo *in vitro* para detectar la presencia o ausencia de una enfermedad y/o trastorno asociado con cáncer, en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto de prueba y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar uno o más marcadores de una enfermedad y/o trastorno asociados con cáncer, por ejemplo, ácido nucleico marcador (por ejemplo, ARNm, ADN genómico), péptido marcador (por ejemplo, polipéptido o proteína) o lípido marcador codificado por el ácido nucleico marcador de tal manera que el la presencia de un ácido nucleico marcador o péptido marcador codificado por el ácido nucleico se detecta en la muestra biológica. En una realización, un agente para detectar ARNm marcador o ADN genómico es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridarse con ARNm marcador o ADN genómico. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico marcador de longitud completa o una porción del mismo. Otras sondas adecuadas para uso en los ensayos de diagnóstico de la invención se describen en este documento.

Un agente para detectar el péptido marcador puede ser un anticuerpo capaz de unirse a un péptido marcador, tal como un anticuerpo con un marcador detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar el marcaje directo de la sonda o anticuerpo acoplado (es decir, uniéndose físicamente) a una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y la marcación final de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada fluorescentemente.

Como se usa en el presente documento, el término "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células (por ejemplo, células fagocíticas, células no fagocíticas, células 2n, >2n células y similares) y fluidos biológicos (por ejemplo, sangre completa, glóbulos blancos y similares) aislado de un sujeto. Es decir, el método de detección de la invención puede usarse para detectar polipéptido marcador, proteína, ARNm, microARN, ADN genómico y similares en una muestra biológica *in vitro*. En una realización, la muestra biológica contiene proteínas y/o polipéptidos del sujeto de prueba. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto de prueba y/o moléculas de ADN genómico del sujeto de prueba. En una realización, la muestra biológica es una muestra de suero, muestra de saliva o una muestra de biopsia aislada por medios convencionales a partir de un sujeto.

En otra realización, los métodos *in vitro* implican además obtener una muestra biológica de control de un sujeto de control (por ejemplo, célula no fagocítica o célula 2n), poner en contacto la muestra de control (por ejemplo, célula no fagocítica o célula 2n) con un compuesto o un agente capaz de detectar polipéptido marcador, lípido de proteína, ARNm, microARN, ADN genómico y similares se detecta en la muestra biológica, y comparar la presencia de polipéptido marcador, lípido de proteína, ARNm, ADN genómico y similares en la muestra de control con la presencia de polipéptido marcador, lípido de proteína, ARNm, ADN genómico y similares en la muestra de prueba (por ejemplo, célula fagocítica o célula >2n). Alternativamente, la presencia de polipéptido marcador, proteína, lípido, ARNm, ADN genómico y similares en la muestra de prueba (por ejemplo, células fagocíticas o células >2n) se puede comparar con la información en una base de datos o en un gráfico para detección o diagnóstico.

En ciertas realizaciones a modo de ejemplo, se proporcionan ensayos de pronóstico. Los métodos de diagnóstico *in vitro* descritos en el presente documento pueden utilizarse además para identificar sujetos que tienen una afección o en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o trastorno asociados con cáncer asociado con la expresión regulada positivamente (o regulada negativamente) de uno o más de los marcadores descritos en este documento. Por ejemplo, los ensayos descritos en este documento, tales como los ensayos de diagnóstico precedentes o los siguientes ensayos, se pueden utilizar para identificar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o un trastorno asociado con cáncer.

Los ensayos de pronóstico descritos en este documento pueden usarse para determinar si a un sujeto puede administrarse un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad y/o trastorno asociado con cáncer, descrito en el presente documento, asociado con uno o más de los marcadores descritos en este documento. Por ejemplo, tales métodos *in vitro* se pueden usar para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente para tratar, mejorar o reducir uno o más síntomas asociados con el cáncer. De este modo, la presente invención proporciona métodos *in vitro* para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente para una enfermedad y/o trastorno asociado con cáncer descrito en este documento.

Los métodos *in vitro* de la invención también pueden usarse para detectar alteraciones genéticas en un gen marcador, determinando así si un sujeto con el gen alterado está en riesgo de desarrollar una enfermedad y/o trastorno asociado con cáncer descrito en el presente documento, caracterizado por mala regulación en una actividad de proteína marcadora o expresión de ácido nucleico, tal como cáncer. En ciertas realizaciones, los métodos *in vitro* incluyen la detección, en una muestra de células (por ejemplo, células de fluido corporal tales como células sanguíneas) del sujeto, la presencia o ausencia de una alteración genética caracterizada por una alteración que afecta la integridad de un gen que codifica un péptido marcador y/o un gen marcador. Por ejemplo, tales alteraciones genéticas se pueden detectar determinando la existencia de al menos uno de: 1) una eliminación de uno o más nucleótidos de uno o más genes marcadores; 2) una adición de uno o más nucleótidos a uno o más genes marcadores; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos de uno o más genes marcadores; 4) una redistribución cromosómica de uno o más genes marcadores; 5) una alteración en el nivel de una transcripción de ARN mensajero de uno o más genes marcadores; 6) modificación aberrante de uno o más genes marcadores, tales como el patrón de metilación del ADN genómico; 7) la presencia de un patrón de empalme de tipo no salvaje de una transcripción de ARN mensajero de uno o más genes marcadores; 8) un nivel de tipo no salvaje de una o más proteínas marcadoras; 9) pérdida alélica de uno o más genes marcadores; y 10) modificación postraducción inapropiada de una o más proteínas marcadoras. Como se describe en el presente documento, existe un gran número de ensayos conocidos en la técnica que se pueden usar para detectar alteraciones en uno o más genes marcadores.

En ciertas realizaciones, la detección de la alteración implica el uso de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 4,683,195, 4,683,202 y

5,854,033), tales como PCR en tiempo real, COLD-PCR, PCR de anclaje, PCR recurrente o RACE PCR, o, alternativamente, en una reacción en cadena de ligación (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran et al., (1988) Science 241: 1077; Prodromou and Pearl (1992) Protein Eng. 5: 827; y Nakazawa et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360), el último de los cuales puede ser particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en un gen marcador (véase Abravaya et al. (1995) Nucleic. Acids Res. 23: 675). Este método *in vitro* puede incluir los pasos de recoger una muestra de células de un sujeto, aislar ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que hibridan específicamente a un gen marcador en condiciones tales que se produce la hibridación y amplificación del gen marcador (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o detectar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control. Se anticipa que la PCR y/o LCR pueden ser deseables para usar como una etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas usadas para detectar mutaciones descritas aquí.

Métodos de amplificación alternativos incluyen: replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173), Q-Beta Replicase (Lizardi et al. (1988) Bio-Technology 6: 1197), o cualquier otro método de amplificación de ácido nucleico, seguido de la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en muy pocos números.

En una realización alternativa, las mutaciones en uno o más genes marcadores de una célula de muestra pueden identificarse mediante alteraciones en los patrones de escisión de las enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de muestra y de control se aísla, se amplifica opcionalmente, se digiere con una o más endonucleasas de restricción, y los tamaños de longitud de los fragmentos se determinan mediante electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en los tamaños de longitud de los fragmentos entre la muestra y el ADN de control indican mutaciones en el ADN de la muestra. Además, el uso de ribozimas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,498,531) puede usarse para puntuar por la presencia de mutaciones específicas mediante el desarrollo o la pérdida de un sitio de escisión de ribozima.

En otras realizaciones, las mutaciones genéticas en uno o más de los marcadores descritos en este documento pueden identificarse hibridando una muestra y ácidos nucleicos de control, por ejemplo, ADN o ARN, a matrices de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas de oligonucleótidos (Cronin et al. (1996) Human Mutation 7: 244; Kozal et al. (1996) Nature Medicine 2: 753). Por ejemplo, las mutaciones genéticas en un ácido nucleico marcador se pueden identificar en matrices bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas por luz como se describe en Cronin, M. T. et al. supra. En resumen, se puede usar una primera serie de sondas de hibridación para escanear largas extensiones de ADN en una muestra y controlar para identificar cambios de bases entre las secuencias haciendo matrices lineales de sondas superpuestas secuenciales. Este paso permite la identificación de mutaciones puntuales. Este paso es seguido por una segunda matriz de hibridación que permite la caracterización de mutaciones específicas utilizando matrices de sondas más pequeñas y especializadas, complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutaciones está compuesta de conjuntos de sondas paralelas, una complementaria al gen de tipo salvaje y la otra complementaria al gen mutante.

En otra realización más, cualquiera de una variedad de reacciones de secuenciación conocidas en la técnica se puede usar para secuenciar directamente un gen marcador y detectar mutaciones comparando la secuencia del gen marcador de muestra con la secuencia de tipo silvestre (control) correspondiente. Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen los basados en técnicas desarrolladas por Maxam and Gilbert ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560) o Sanger ((1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463). También se contempla que cualquiera de una variedad de procedimientos de secuenciación automatizada puede utilizarse cuando se realizan los ensayos de diagnóstico ((1995) Biotechniques 19: 448), incluida la secuenciación por espectrometría de masas (véase, por ejemplo, Publicación Internacional PCT No. WO 94/16101 Cohen et al (1996) Adv. Chromatogr. 36: 127-162 y Griffin et al (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147).

Otros métodos *in vitro* para detectar mutaciones en un gen marcador incluyen métodos en los que se usa protección contra agentes de escisión para detectar bases desajustadas en heterodúplex ARN/ARN o ARN/ADN (Myers et al. (1985) Science 230: 1242). En general, la técnica del arte de "escisión por desajuste" comienza proporcionando heterodúplex formados hibridando ARN o ADN (marcados) que contiene la secuencia marcadora de tipo salvaje con ARN o ADN potencialmente mutante obtenidos a partir de una muestra de tejido. Los dúplex de doble cadena se tratan con un agente que escinde las regiones de cadena sencilla del dúplex, tales como las que existirán debido a apareamientos incorrectos de pares de bases entre las cadenas testigo y de muestra. Por ejemplo, los dúplex de ARN/ADN pueden tratarse con ARNasa y los híbridos de ADN/ADN tratados con la nucleasa SI para digerir enzimáticamente las regiones mal emparejadas. En otras realizaciones, los dúplex de ADN/ADN o ARN/ADN pueden tratarse con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina para digerir regiones mal emparejadas. Después de la digestión de las regiones mal emparejadas, el material resultante se separa por tamaño en geles de poliacrilamida desnaturizantes para determinar el sitio de la mutación. Véase, por ejemplo, Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeba et al. (1992) Methods Enzymol. 217: 286. En una realización, el ADN o ARN de control puede marcarse para la detección.

En otra realización más, la reacción de escisión por desajuste emplea una o más proteínas que reconocen pares de bases desapareadas en ADN de doble cadena (denominadas enzimas "reparación de desajuste de ADN") en sistemas definidos para detectar y mapear mutaciones puntuales en ADNc marcadores obtenidos a partir de muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde A en apareamientos erróneos G/A y la timidina ADN glucosilasa de células HeLa escinde T en apareamientos erróneos G/T (Hsu et al (1994) *Carcinogenesis* 15: 1657). De acuerdo con una realización de ejemplo, una sonda basada en una secuencia marcadora, por ejemplo, una secuencia marcadora de tipo salvaje, se hibrida con un ADNc u otro producto de ADN de una o más células de prueba. El dúplex se trata con una enzima de reparación de desajuste de ADN, y los productos de escisión, si los hay, se pueden detectar a partir de protocolos de electroforesis o similares. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,459,039.

En otras realizaciones, las alteraciones en la movilidad electroforética se usarán para identificar mutaciones en genes marcadores. Por ejemplo, el polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) puede usarse para detectar diferencias en la movilidad electroforética entre ácidos nucleicos mutantes y de tipo salvaje (Orita et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766, véase también Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285: 125, and Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. App.* 9:73). Los fragmentos de ADN de cadena sencilla de la muestra y los ácidos nucleicos marcadores de control se desnaturalizarán y se dejarán renaturalizar. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos de cadena sencilla varía según la secuencia, la alteración resultante en la movilidad electroforética permite la detección de incluso un único cambio de base. Los fragmentos de ADN pueden marcarse o detectarse con sondas marcadas. La sensibilidad del ensayo puede mejorarse mediante el uso de ARN (en lugar de ADN), en donde la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización, el presente método utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas de heterodúplex bicatenarias sobre la base de cambios en la movilidad electroforética (Keen et al (1991) *Trends Genet.*, 7:5).

En otra realización más, se ensaya el movimiento de fragmentos mutantes o de tipo salvaje en geles de poliacrilamida que contienen un gradiente de desnaturizante utilizando electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) (Myers et al. (1985) *Nature* 313: 495). Cuando se usa DGGE como el método de análisis, el ADN se modificará para asegurar que no se desnaturalice por completo, por ejemplo, mediante la adición de una pinza GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico en GC de alto punto de fusión por PCR. En una realización adicional, se usa un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente de desnaturización para identificar diferencias en la movilidad del ADN de control y de muestra (Rosenbaum and Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265: 12753).

Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero sin limitación, hibridación de oligonucleótidos selectiva, amplificación selectiva o extensión de cebador selectivo. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores de oligonucleótidos en los que la mutación conocida se coloca centralmente y luego se hibrida con el ADN diana en condiciones que permiten la hibridación solo si se encuentra una coincidencia perfecta (Saiki et al., *Nature* 324: 163; Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230). Tales oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan con ADN diana amplificado por PCR o una serie de mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos se unen a la membrana de hibridación y se hibridan con ADN diana marcado.

Alternativamente, la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación por PCR selectiva se puede usar junto con la presente invención. Los oligonucleótidos usados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (de modo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs et al (1989) *Nucl. Acids Res.* 17: 2437) o en el extremo 3' final de un cebador donde, en condiciones apropiadas, la falta de coincidencia puede prevenir o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11: 238). Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en escisión (Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell Probes* 6:1). Se anticipa que en ciertas realizaciones la amplificación también puede realizarse usando Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189). En tales casos, la ligación ocurrirá solo si hay una coincidencia perfecta en el extremo 3' de la secuencia 5', lo que permite detectar la presencia de una mutación conocida en un sitio específico buscando la presencia o ausencia de amplificación.

Se debe entender que las realizaciones de la presente invención que se han descrito son meramente ilustrativas de algunas de las aplicaciones de los principios de la presente invención. Los expertos en la materia pueden realizar numerosas modificaciones basadas en las enseñanzas presentadas en este documento.

Los siguientes ejemplos se exponen como representativos de la presente invención. Estos ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención, ya que estas y otras realizaciones equivalentes serán evidentes a la vista de la presente divulgación, las figuras y las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

Método representativo I para la separación de células fagocíticas de células no fagocíticas y el análisis de perfiles de expresión

1. Con referencia a las Figuras 2 y 3, cubrir las placas con avidina.

2. Añadir anticuerpo biotinilado a células sanguíneas no fagocíticas (por ejemplo, células T) a los pozos, incubar durante 30 min a TA, lavar pozos.
3. Agregar perlas magnéticas.
4. Agregar muestra de sangre glóbulos blancos.
- 5 5. Incubar a 37°C (30 minutos-1 hora).
6. Después de la fagocitosis de perlas por células fagocíticas y unión de avidina-biotina-anticuerpo a células no fagocíticas, colocar la placa encima del imán y lavar (las células fagocíticas que internalizaron las perlas magnéticas y se mantendrán las células no fagocíticas unidas al anticuerpo; todas las demás células serán eliminadas).
7. Retirar el imán y recolectar las células fagocíticas.
- 10 8. Aislar ARN de células fagocíticas (por ejemplo, células unidas a un cordón magnético) y de células no fagocíticas (por ejemplo, aquellas células unidas al fondo de los pozos a través del anticuerpo biotinilado anticélulas no fagocíticas unido a avidina), preparar ADNc, ARNc y usar para diferenciar los perfiles genéticos (por ejemplo, matrices de genes completos y/o matrices de genes de cáncer) de células fagocíticas y no fagocíticas.
- 15 9. Aislar el ADN de cada muestra de células e identificar los distintivos de ADN tumoral presentes de forma selectiva en los fagocitos (es decir, ausentes en los no fagocitos); comparar los perfiles (por ejemplo, matrices completas de genes, mutaciones de ADN y/o SNP obtenidos en células fagocíticas y no fagocíticas).
- 20 10. Aislar la proteína de cada muestra de células, realizar inmunotransferencias Western usando anticuerpos contra proteínas conocidas sobreexpresadas por tumores humanos (por ejemplo, PSA y PSMA en cáncer de próstata, CEA en cáncer de colon y CAI 25 en cáncer de ovario), y comparar los perfiles obtenidos en células fagocíticas y no fagocíticas. Alternativamente, usar espectroscopía de masas para identificar las proteínas.
11. Aislar los lípidos de cada muestra de células y comparar cantidad y calidad, por ejemplo, usando HPLC.

Ejemplo 2

Método representativo II para la separación de células fagocíticas de células no fagocíticas y el análisis de perfiles de expresión

- 25 1. Con referencia a las Figuras 2 y 3, lise los glóbulos rojos en la muestra de sangre.
2. Someter los glóbulos blancos a rotación celular en portaobjetos de vidrio.
3. Fijar las células en acetona/metanol (-20°C durante 5 minutos).
4. Teñir con tinción de hematoxilina y eosina y anticuerpo anti-células T.
5. Aislar células T (no fagocíticas) y macrófagos (fagocíticas) utilizando microscopía de captura láser (LCM).
- 30 6. Aislar ARN de células fagocíticas y de células no fagocíticas, preparar ADNc, ARNc y usar para diferenciar los perfiles genéticos (por ejemplo, matrices de genes completos y/o matrices de genes de cáncer) de células fagocíticas y no fagocíticas.
7. Aislar el ADN de cada muestra de células, ejecutar matrices de ADN, y comparar los perfiles (por ejemplo, matrices de genes completos, mutaciones de ADN y/o SNP) obtenidos en células fagocíticas y no fagocíticas.
- 35 8. Aislar la proteína de cada muestra celular, realizar inmunotransferencias Western usando anticuerpos contra proteínas conocidas sobreexpresadas por tumores humanos (por ejemplo, PSA y PSMA en cáncer de próstata, CEA en cáncer de colon y CA125 en cáncer de ovario) y comparar los perfiles obtenidos en fagocitosis y células no fagocíticas. Alternativamente, usar espectroscopía de masas para identificar las proteínas.
9. Aislar los lípidos de cada muestra de células y comparar cantidad y calidad, por ejemplo, usando HPLC.

40 Ejemplo 3

Método representativo III para la separación de células fagocíticas de células no fagocíticas y el análisis de perfiles de expresión

1. Con referencia a las Figuras 2 y 3, someter a lisis RBC de una muestra de sangre.
2. Usar perlas conjugadas con anticuerpos magnéticos para aislar células no fagocíticas (por ejemplo, Células T) y fagocíticas (por ejemplo, Neutrófilos y/o macrófagos y/o monocitos) de sangre entera.

45

ES 2 663 662 T3

3. Aislar el ARN de cada muestra de células, preparar ADNc, ARNc y usar para diferenciar los perfiles genéticos (por ejemplo, conjunto de genes de cáncer) de células fagocíticas y no fagocíticas.

4. Aislar el ADN de cada muestra de células, ejecutar matrices de ADN y comparar los perfiles obtenidos en las células fagocíticas y no fagocíticas.

5 5. Aislar la proteína de cada muestra celular, realizar inmunotransferencias Western utilizando anticuerpos contra proteínas conocidas sobreexpresadas por tumores humanos (por ejemplo, PSA y PSMA en cáncer de próstata, CEA en cáncer de colon y CA125 en cáncer de ovario), y comparar los perfiles obtenidos en fagocitosis y células no fagocíticas. Alternativamente, usar espectroscopía de masas para identificar las proteínas.

6. Aislar los lípidos de cada muestra de células y comparar cantidad y calidad, por ejemplo, usando HPLC.

10 Ejemplo 4

Método representativo IV para la separación de células fagocíticas de células no fagocíticas y el análisis de perfiles de expresión

1. Con referencia a las Figuras 2 y 3, teñir los glóbulos blancos con anticuerpos fluorescentes específicos contra una subpoblación celular particular (por ejemplo, neutrófilos, macrófagos, monocitos, células T y similares).

15 2. Ordenar las celdas (por ejemplo, por FACS).

3. Aislar el ARN de cada muestra de células, preparar ADNc, ARNc y usar para diferenciar los perfiles genéticos (por ejemplo, conjunto de genes de cáncer) de células fagocíticas y no fagocíticas.

4. Aislar el ADN de cada muestra de células, ejecutar matrices de ADN y comparar los perfiles obtenidos en las células fagocíticas y no fagocíticas.

20 5. Aislar la proteína de cada muestra celular, realizar inmunotransferencias Western utilizando anticuerpos contra proteínas conocidas sobreexpresadas por tumores humanos (por ejemplo, PSA y PSMA en cáncer de próstata, CEA en cáncer de colon y CA125 en cáncer de ovario), y comparar los perfiles obtenidos en fagocitosis y células no fagocíticas. Alternativamente, usar espectroscopía de masas para identificar las proteínas.

6. Aislar los lípidos de cada muestra de células y comparar cantidad y calidad, por ejemplo, usando HPLC.

25 Ejemplo 5

Método representativo V para la separación de células fagocíticas de células no fagocíticas y el análisis de perfiles de expresión

30 1. Con referencia a las Figuras 5 y 6, teñir glóbulos blancos con anticuerpos fluorescentes para cada subpoblación celular (por ejemplo, neutrófilos, macrófagos, monocitos y células T), y luego teñir con colorante de ADN (por ejemplo, yoduro de propidio).

2. Clasificar las células (FACS) en células T, neutrófilos (2n), neutrófilos (> 2n), macrófagos (2n), macrófagos (>2n), monocitos (2n) y monocitos (>2n).

35 3. Aislar el ARN de las células T, neutrófilos (>2n), macrófagos (>2n) y monocitos (>2n). A continuación, preparar ADNc, ARNc y usar para diferenciar los perfiles genéticos (por ejemplo, conjunto de genes cancerosos) de células fagocíticas y no fagocíticas.

4. Aislar ADN de células T, neutrófilos (>2n), macrófagos (>2n) y monocitos (>2n). Ejecutar matrices de ADN y comparar los perfiles obtenidos en las células fagocíticas y no fagocíticas.

40 5. Aislar proteína de células T, neutrófilos (>2n), macrófagos (>2n) y monocitos (>2n). Ejecutar inmunotransferencias Western usando anticuerpos para proteínas conocidas sobreexpresadas por tumores humanos (por ejemplo, PSA y PSMA en cáncer de próstata, CEA en cáncer de colon y CAI 25 en cáncer de ovario), y comparar los perfiles obtenidos en células fagocíticas y no fagocíticas. Alternativamente, usar espectroscopía de masas para identificar las proteínas.

6. Aislar los lípidos de las células T, neutrófilos (>2n), macrófagos (>2n) y monocitos (>2n). Comparar la cantidad y calidad de lípidos, por ejemplo, usando HPLC

45 Ejemplo 6

Método representativo VI para la separación de células fagocíticas y el análisis de perfiles de expresión

1. Con referencia a las figuras 5 y 6, teñir glóbulos blancos con anticuerpos fluorescentes específicos contra una o más células fagocíticas (por ejemplo, neutrófilos, macrófagos o monocitos) y luego teñir con colorante de unión a ADN (por ejemplo, yoduro de propidio).

2. Clasificar las celdas (FACS) en $2n$ y $>2n$ fagocitos.

5 3. Aislar el ARN de cada uno de los fagos $2n$ y $>2n$. Preparar ADNc, ARNc y usar para diferenciar los perfiles genéticos (por ejemplo, conjunto de genes cancerosos) de células $2n$ -fagocíticas y $>2n$ -fagocíticas.

4. Aislar el ADN de cada uno de los fagocitos $2n$ y $>2n$. Ejecutar matrices de ADN y comparar los perfiles obtenidos a partir de células $2n$ -fagocíticas y $>2n$ -fagocíticas.

10 5. Aislar la proteína de cada uno de los fagocitos $2n$ y $>2n$. Ejecutar inmunotransferencias Western usando anticuerpos para proteínas conocidas sobreexpresadas por tumores humanos (por ejemplo, PSA y PSMA en cáncer de próstata, CEA en cáncer de colon y CA125 en cáncer de ovario), y comparar los perfiles obtenidos a partir de células $2n$ -fagocíticas y $>2n$ -fagocíticas.

6. Aislar los lípidos de cada uno de los fagocitos $2n$ y $>2n$. Comparar la cantidad y la calidad de los lípidos, por ejemplo, usando HPLC.

15 Ejemplo 7

Detección de distintivos genéticos específicos de tumor en fagocitos obtenidos a partir de ratones portadores de tumor

20 De acuerdo con las realizaciones de la presente invención, se proporcionan métodos *in vitro* para diferenciar entre distintivos "ruido no específico normal" y "específico de tumor" en sangre u otros fluidos corporales. Los perfiles de expresión génica de monocitos/macrófagos y neutrófilos sanguíneos de ratones portadores de tumores se compararon con los de células T no fagocíticas de los mismos ratones donantes para identificar los distintivos específicos de tumores dentro de las células fagocíticas que o bien no se expresaban o bien se diferenciaban significativamente expresados en células no fagocíticas de los mismos ratones portadores de tumores y de animales que no tienen tumores.

Células cancerosas LNCaP de próstata humana

25 Se inyectaron ratones atímicos desnudos ($n=5$) por vía subcutánea (s.c.) con células de cáncer de próstata LNCaP humanas. Veintisiete días después (tamaño del tumor = ~ 0.4 cm), los ratones se sangraron mediante punción cardíaca (~ 1 mL/ratón) en tubos que contenían EDTA que se centrifugaron a continuación. La capa leucocítica se aisló y se lavó, y los neutrófilos, macrófagos y células T se separaron usando, respectivamente, DynaBeads inmunomagnéticas de neutrófilos, macrófagos y células T anti-ratón. Se aisló ARN de cada muestra de células (Triazol[®]). La calidad del ARN se determinó como se muestra en la Figura 3. El rendimiento de ARN se muestra en la Figura 20. Se prepararon ADNc y ARNc biotinilado (ARNc-B). Finalmente, las muestras de ARNc-B se incubaron con micromatrices humanas de genes cancerosos (Oligo GEArray[®] Human Cancer PathwayFinder Microarray - OHS-033-SuperArray Bioscience). Después de la hibridación, las membranas se lavaron y tiñeron con avidina-fosfatasa alcalina, y los genes se detectaron usando quimioluminiscencia (película de rayos X).

35 Tumores de adenocarcinoma de colon humano LS174T, células de carcinoma LLC1, células de melanoma de ratón B16F10

40 Se llevaron a cabo experimentos similares con células aisladas de ratones desnudos atímicos ($n = 5$) inyectados s.c. con tumores de adenocarcinoma de colon LS174T humano (tamaño tumoral = ~ 0.3 cm), ratones C57B1 ($n = 5$) inyectados s.c. con células de carcinoma LLC1 de pulmón de Lewis (tamaño de tumor = -0.6 cm) y ratones C57B1 ($n = 5$) inyectados por vía intravenosa 22 días antes con 10^6 células de melanoma de ratón B16F10 (cuando las células tumorales eran de origen de ratón, las muestras de ARNc-B se hibridaron con el cáncer de ratón Oligo GEArray[®] PathwayFinder Microarray - OMM-033 - SuperArray Bioscience). El ARN también se aisló de células LS174T, LLC1, BI 6F10 y LNCaP que crecían exponencialmente en cultivo y de neutrófilos, macrófagos y células T aisladas de ratones C57B1 y ratones desnudos sin tumor, y se determinaron sus perfiles genéticos relacionados con el cáncer.

45 De acuerdo con los datos obtenidos de estos experimentos y mostrados en las Figuras 9-17, los neutrófilos y macrófagos, obtenidos de ratones inyectados con células de próstata humana o de tumor de colon y de ratones que tienen cáncer de pulmón de ratón o melanoma, tienen diversos distintivos genéticos relacionados con el cáncer que también se encuentran en sus respectivas células tumorales. Estos genes relacionados con el cáncer no fueron expresados o fueron expresados mínimamente por (i) células T no fagocíticas aisladas de ratones portadores de tumores; y (ii) neutrófilos y macrófagos fagocíticos obtenidos de ratones que no tienen tumores.

50 Por ejemplo, los neutrófilos aislados de la sangre de ratones desnudos portadores de células de cáncer de próstata humano LNCaP expresaron varios distintivos de genes tumorales humanos (Human Cancer PathwayFinder Microarray) que también se expresaron en células LNCaP (comparar perfiles de matrices en las Figuras 9A y 9B). Estos genes no fueron expresados o fueron expresados mínimamente en células T obtenidas de ratones portadores

de tumores o neutrófilos aislados de ratones normales (véanse los perfiles en las Figuras 9C y 9D). De forma similar, los neutrófilos aislados de la sangre de ratones portadores de células de cáncer de pulmón de ratón LLC1 expresaron varios distintivos de genes tumorales de ratón (Mouse Cancer PathwayFinder Microarray) que se expresaron en células LLC1 (comparar perfiles de matrices en las Figuras 13A y 13B).

5 Estos genes no fueron expresados o fueron expresados mínimamente en células T obtenidas de ratones portadores de tumores o neutrófilos aislados de ratones normales (véanse los perfiles mostrados en las Figuras 13C y 13D). Finalmente, se escanearon las matrices, se cuantificó la intensidad de cada gen usando el software proporcionado por la compañía y aquellos genes sobreexpresados selectivamente por células fagocíticas identificadas como se muestra en las Figuras 19 y 20. Las Figuras 21 y 22 muestran los distintivos genéticos adquiridos y exhibidos diferencialmente por los glóbulos blancos fagocíticos de ratones portadores de tumores. Como se muestra en la
10 Figura 21, se detectaron muchos oncogenes (genes representados en rojo, por ejemplo, ERBB2 y Jun) y a menudo se expresaron simultáneamente en macrófagos y neutrófilos.

Se inyectaron ratones C57BI (n = 5) por vía subcutánea con células de carcinoma de pulmón de Lewis 1E6 Lewis (LLC1). Veinte días más tarde, los ratones fueron anestesiados y sangrados por punción cardíaca (aproximadamente
15 1 mL/ratón) en un tubo que contenía EDTA. Después de la centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, la capa leucocítica se transfirió a un tubo y se lavó con PBS.

Se incubaron anticuerpos IgG de rata de macrófago/monocito anti-ratón (marcador monocítico/macrófago - F4/80 - IgG2b de AbD Serotec, Raleigh, NC) (temperatura ambiente durante 30 minutos) con perlas magnéticas de anticuerpo IgG anti-rata (DYNABEAD®) IgG anti-rata de oveja de INVITROGEN™, Carlsbad, CA). Los glóbulos anti-
20 macrófagos/monocitos se lavaron a continuación en PBS y se almacenaron en hielo.

Se incubó IgG de rata de neutrófilos anti-ratón (marcador de neutrófilos NIMP-R14 - IgG2a - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) (temperatura ambiente durante 30 minutos) con perlas magnéticas de anticuerpos IgG anti-rata (antígeno de oveja DYNABEAD®) IgG anti-rata de oveja - INVITROGEN™), se lavó en PBS y se almacenó en hielo.

25 Se lavaron también perlas de Pan T (Thy 1.2) de ratón DYNABEAD® (INVITROGEN™) en PBS y se almacenaron en hielo.

Se aislaron macrófagos de sangre de ratón y monocitos a partir de la suspensión de glóbulos blancos preparada anteriormente usando las perlas de anti-macrófagos/monocitos. En esencia, las perlas se añadieron a la muestra de glóbulos blancos y después de su incubación (4°C durante 30 minutos), las perlas unidas a macrófagos se aislaron usando un imán y se lavaron con PBS tres veces y se almacenaron en hielo.
30

Las células T de ratón se aislaron a continuación del resto de glóbulos blancos. En resumen, las perlas de células T anti-ratón se añadieron a la suspensión de glóbulos blancos, las muestras se incubaron (4°C durante 30 minutos), las perlas unidas a células T se aislaron usando un imán, se lavaron con PBS y se almacenaron en hielo.

Finalmente, se aislaron neutrófilos de ratón a partir de la muestra de glóbulos blancos restante. Las perlas magnéticas de neutrófilos anti-ratón se añadieron a las células y las muestras se incubaron (4°C durante 30 minutos). Las perlas unidas a neutrófilos se aislaron usando un imán, se lavaron con PBS y se almacenaron en hielo.
35

A continuación, se aisló el ARN de cada muestra (usando TRIZOL®, INVITROGEN™, Carlsbad, CA). La calidad del ARN se determinó como se muestra en la Figura 7. El rendimiento del ARN se muestra en la Figura 8. A continuación, se prepararon e incubaron ADNc (biotinilados) (60°C durante la noche) con micromatrices humanas de genes cancerosos (OLIGO GEARRA Y® Human Cancer PathwayFinder Microarray OMM-033, SuperArray Bioscience, Frederick, MD). Después de la hibridación, las membranas se lavaron y se tiñeron con avidina-fosfatasa alcalina y los genes se detectaron usando quimioluminiscencia (película de rayos X).
40

Tumores de adenocarcinoma de colon humano LS175T, carcinoma LLC1 y células de melanoma de ratón B16F10

45 Se llevaron a cabo experimentos similares con células aisladas de ratones desnudos atímicos (n = 5) inyectados s.c. con tumores de adenocarcinoma de colon LS174T humano (tamaño tumoral = ~0,3 cm), ratones C57/B1 (n = 5) inyectados s.c. con células de carcinoma LLC1 de ratón de pulmón de Lewis (tamaño de tumor = ~0.6 cm) y ratones C57B1 (n = 5) inyectados por vía intravenosa 22 días antes con 10⁶ células de melanoma de ratón B16F10 (cuando las células tumorales eran de origen de ratón, las muestras de ARNc-B se hibridaron con el Oligo GEARRAY®
50 Mouse Cancer PathwayFinder Microarray - OMM-033 - SuperArray Bioscience (cuando los tumores eran de origen humano, se usó Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder Microarray - OHS-033). El ARN también se aisló de forma exponencial se determinaron células LS174T, LLC1, BI 6F10 y LNCaP en cultivo y a partir de neutrófilos, macrófagos y células T aisladas de ratones C57B1 y ratones desnudos sin tumor, y se determinaron sus perfiles génicos relacionados con el cáncer.

55 De acuerdo con los datos obtenidos de estos experimentos y mostrados en las Figuras 9A-9D, 10A-10D, 11A-11D, 12A-12D, 13A-13D, 14A-14D, 15A-15D, 16A-16D, neutrófilos y macrófagos (obtenido de ratones inyectados con

células tumorales de próstata o colon humanas y de ratones que portan cáncer de pulmón de ratón o melanoma) tenían diversos distintivos genéticos relacionados con el cáncer que también se encontraron en sus respectivas células tumorales (Figura 21). Estos genes relacionados con el cáncer no fueron expresados o fueron expresados mínimamente por (i) células T no fagocíticas aisladas de ratones portadores de tumores; y (ii) neutrófilos y macrófagos fagocíticos obtenidos de ratones que no tienen tumores.

Por ejemplo, los neutrófilos aislados de la sangre de ratones desnudos que llevan células de cáncer de próstata humano LNCaP expresan siete distintivos de genes de tumores humanos (Human Cancer PathwayFinder Microarray) que también se expresaron en células LNCaP (comparar los perfiles de las matrices en las figuras 9A y 9B). Estos genes no fueron expresados o fueron expresados mínimamente en células T obtenidas de ratones portadores de tumores o neutrófilos aislados de ratones normales (véanse los perfiles en las Figuras 9C y 9D). Finalmente, se escanearon las matrices, se cuantificó la intensidad de cada gen usando el software proporcionado por la compañía y aquellos genes sobreexpresados selectivamente por células fagocíticas identificadas como se muestra en las Figuras 19 y 20. Las Figuras 21 y 22 muestran los distintivos genéticos adquiridos y exhibidos diferencialmente por los glóbulos blancos fagocíticos de ratones portadores de tumores. Como se muestra en la Figura 21, muchos oncogenes (por ejemplo, ERBB 2 y Jun) se detectaron y con frecuencia se expresaron simultáneamente en macrófagos y neutrófilos (mostrados por los genes resaltados en verde).

Ejemplo 8

Detección de distintivos genéticos específicos de tumor en fagocitos obtenidos de pacientes con cáncer

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, los perfiles de expresión génica de monocitos/macrófagos y neutrófilos sanguíneos de pacientes con cáncer se compararon con los de células T no fagocíticas de los mismos individuos donantes para identificar los distintivos específicos del tumor dentro de las células fagocíticas que no se expresaron o se expresaron significativamente diferencialmente en células no fagocíticas.

Pacientes con tumores de cabeza y cuello

Se obtuvieron diez mililitros de sangre venosa (en un tubo que contiene EDTA) de pacientes que se sabía que tenían carcinoma de células escamosas del cuello y estaban programados para cirugía. Después de la centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, la capa leucocítica se transfirió a un tubo y se lavó con PBS.

Las células se separaron utilizando DynaBeads® inmunomagnético antihumano de células T, neutrófilos y macrófagos/monocitos de INVITROGEN™, Carlsbad, CA. En esencia, las perlas se añadieron consecutivamente a la muestra de glóbulos blancos y después de incubaciones individuales a 4°C, 30 minutos, las células T, neutrófilos y macrófagos/perlas unidas a monocitos se aislaron usando un imán y se lavaron con PBS tres veces.

A continuación, se aisló el ARN de cada muestra (usando TRIZOL®, INVITROGEN™, Carlsbad, CA). Se determinó la cantidad y calidad de ARN y se prepararon ADNc y ARNc biotinilados (ARNc-B). Finalmente, las muestras de ARNc-B se incubaron (60°C durante la noche) con micromatrices humanas de gen canceroso (Oligo GEArray® Human Cancer PathwayFinder Microarray - OHS-033 - SuperArray Bioscience, Frederick, MD). Después de la hibridación, las membranas se lavaron y tificaron con avidina-fosfatasa alcalina, y los genes se detectaron usando quimioluminiscencia (película de rayos X).

De acuerdo con los datos obtenidos de estos experimentos, los neutrófilos y macrófagos (obtenidos de pacientes con cáncer de cabeza y cuello) tenían diversos distintivos genéticos relacionados con el cáncer que también se encontraban en sus respectivas células tumorales. Estos genes relacionados con el cáncer no fueron expresados o fueron expresados mínimamente por células T no fagocíticas.

Por ejemplo, los neutrófilos aislados de la sangre de uno de estos pacientes expresaron cuatro distintivos de tumores humanos de genes (Human Cancer PathwayFinder Microarray) que también se expresaron en la biopsia del tumor obtenida del mismo paciente (comparar los perfiles de las matrices en las figuras 17B y 17C). Estos genes no fueron expresados o fueron expresados mínimamente en la biopsia cutánea normal y en las células T aisladas de la misma muestra de sangre (véanse los perfiles en las Figuras 17A y 17D, respectivamente). Por último, se escanearon las matrices, la intensidad de cada gen se cuantificó usando el software proporcionado por la empresa, y se identificaron los siguientes genes que se sobreexpresan (>2 veces) selectivamente por las células fagocíticas: E26 oncógeno viral registro de homo (ETS2), proteína interactiva Tat de VIH-I (HTAT 1P2), IL8 (activación de neutrófilos y quimiotaxis), oncógeno Jun (JUN) y metaloproteína 9 de matriz (MMP9).

Pacientes con cáncer de ovario

Se llevaron a cabo experimentos similares con células aisladas de un paciente con cáncer de ovario. De acuerdo con los datos obtenidos de estos experimentos, los neutrófilos y macrófagos (obtenidos de la mujer enferma) expresaron muchos genes relacionados con el cáncer que no fueron expresados o fueron expresados mínimamente por células T no fagocíticas.

Por ejemplo, los macrófagos aislados de la sangre del paciente con cáncer de ovario expresaron 23 distintivos de genes de tumores humanos (Human Cancer PathwayFinder Microarray) que no se expresaron o expresaron mínimamente en células T aisladas de la misma muestra de sangre (comparar perfiles en las Figuras 18A y 18B). Finalmente, se escanearon las matrices, se cuantificó la intensidad de cada gen utilizando el software proporcionado por la empresa y se determinaron las intensidades de cada gen relacionado con el cáncer en cada tipo de célula. La lista de 23 genes relacionados con cáncer diferencialmente sobreexpresados/sobrerregulados en macrófagos así como las relaciones de intensidad de macrófagos a células T se muestran en la Figura 22. Obsérvese que se detectó un total de cinco oncógenos (mostrados en rojo en la Figura 21) .

Ejemplo 9

10 Detección de distintivos proteicos específicos de tumor en fagocitos obtenidos de ratones que portan tumores de LNCaP de próstata humana y tumores de colon humano LS174T

Se usó un kit de purificación de proteínas (Norgen, Incorporated, producto No. 23500) para aislar y purificar proteínas de glóbulos blancos, células T y macrófagos de ratón. El ensayo fue muy simple y rápido (aproximadamente 30 minutos) y las proteínas aisladas, que fueron de alta calidad y excelente rendimiento (117.6 ± 10.60 µg por 4 mL de sangre, n = 5), pudieron usarse en varias aplicaciones posteriores, tal como el análisis SDS-PAGE como se muestra en la Figura 23 e inmunoprecipitación Western.

Se aislaron muestras de proteínas de células fagocíticas (monocitos/macrófagos) y no fagocíticas (linfocitos T) obtenidas de ratones portadores de tumores LNCaP y LS174T para estos estudios, ya que la primera línea celular expresa PSA (Denmeade et al. (2001) Prostate 48:1; Lin et al (2001) J. Urol. 166: 1943) y la última muestra una glicoproteína específica de tumor (TAG-72), una mucina de alto peso molecular (Colcher et al., (1981) Proc. Natl Acad. Sci. USA 78: 3199); Colcher et al. (1984) Cancer Res. 44: 5744; Kassis et al. (1996) J. Nucl. Med. 37: 343. El análisis de inmunotransferencia de Western se llevó a cabo con 16 µg de las muestras proteicas purificadas. En esencia, cada muestra se mezcló con dos volúmenes de regulador de carga de SDS y se ejecutó en SDS-PAGE al 10% junto con estándares de precisión sin tinción más proteína (Biorad) en regulador Tris-glicina-SDS (pH 8.4) a 200 voltios. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (durante la noche a 4°C) usando un aparato Mini Trans-Blot (Biorad) y un regulador de transferencia que contenía Tris 25 mM, pH 8.4, glicina 192 mM y metanol al 20%. La membrana se bloqueó con 5% de leche desnatada en polvo (60 min a temperatura ambiente (TA)) y se incubó (1 hora, TA) con B72.3, un anticuerpo monoclonal de ratón contra TAG-72 humano, o ER-PR8, un anticuerpo monoclonal de ratón contra PSA humano. Las transferencias se lavaron y luego se incubaron con el conjugado Immun-Star Goat Anti Mouse-HRP (Biorad), un anticuerpo secundario específico para IgG de ratón, y se desarrollaron mediante incubación (5 min, TA) con una mezcla 1:1 de solución de luminol y peróxido regulador (Biorad), seguido de autorradiografía.

Los datos indicaban claramente que las células fagocíticas de ratones con tumor LNCaP eran positivas para PSA, mientras que esta proteína no podía detectarse en células T no fagocíticas de los mismos animales que se muestran en la Figura 24. De forma similar, TAG-72 era expresado por monocitos/macrófagos obtenidos de ratones portadores de tumores LS174T y estaba completamente ausente en las células T de los mismos animales. Estos hallazgos demuestran la "adquisición" y expresión de distintivos proteicos específicos de tumores por células fagocíticas.

Si bien estos datos son específicos de animales con cáncer y células fagocíticas y no fagocíticas obtenidas de la sangre de ratones, los métodos *in vitro* descritos también son útiles en humanos y con células fagocíticas y no fagocíticas obtenidas de otros fluidos corporales.

Ejemplo 10

Experimentos de perfílación

Aislamiento de células fagocíticas sanguíneas

45 Se obtiene una muestra de sangre de un paciente. La sangre (~5 mL) se transferirá a un tubo de 50 mL que contiene 50 µL de EDTA 0,5 M (concentración final de EDTA = ~4.8 mM). El tubo se agitará suavemente con vórtex y se agregarán 25 mL de regulador de lisis RBC (Norgen, Incorporated). El tubo se agitará de nuevo suavemente, se incubará a temperatura ambiente hasta que el color de la solución cambie a rojo brillante (3-5 minutos) y se centrifugará a 2000 rpm durante 3 minutos. Después de una aspiración cuidadosa del sobrenadante, los glóbulos blancos se lavarán con 40 mL de PBS 0.1 M libre de Ca/Mg (que contiene 2% de FBS, 2 mM de EDTA y 20 mM de glucosa), y las células (10⁶/mL) serán luego incubadas (30 min, 4°C, en la oscuridad) con una solución de tinción celular que contiene (i) el ADN, tinción viable para células Hoechst 33342 (4 µg/mL; Em = 483 nm), (ii) los anticuerpos monoclonales monocitos/macrófagos humanos (Alexa Fluor® 647-conjugado; Em = 668 nm), que reconocen el antígeno F4/80 humano expresado por monocitos/macrófagos circulantes, y (iii) el anticuerpo monoclonal neutrófilo antihumano (RPE) conjugado; Em = 578 nm), que reconoce neutrófilos circulantes humanos. Las células se lavarán y clasificarán (BD FACSAria) en neutrófilos (Nn = 2), neutrófilos (Nn >2), monocitos/macrófagos (M/Mn = 2) y monocitos/macrófagos (M/Mn >2).

Perfilación genética

Se realizarán perfiles de genes del genoma completo humano. Para muestras de ARN obtenidas de células tumorales humanas o neutrófilos ($N_n = 2$, $N_n > 2$) y monocitos/macrófagos ($M/M_n = 2$, $M/M_n > 2$), se utilizará GeneChip® Human Genome UI 33 Plus 2.0 Array de Affymetrix, Incorporated. Este conjunto analiza el nivel de expresión de más de 47000 transcripciones y variantes, incluidos 38500 genes humanos bien caracterizados. En general, el ARN extraído se usará para determinar los perfiles de expresión de genes humanos usando la matriz mencionada anteriormente. Para garantizar la reproducibilidad de la matriz, cada muestra se perfilará por triplicado y el experimento se repetirá una vez. Los datos de micromatrices se filtrarán por genes relacionados con la inducción de cáncer como se describe a continuación y se validarán usando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real, (RT-PCR) de transcriptasa reversa.

Sobrerregulación/subregulación de genes relacionados con la inducción del cáncer

El ARN se aislará usando Triazol (Invitrogen, Incorporated) y se purificará usando los cartuchos proporcionados en el kit. La calidad y cantidad del ARN se evaluarán con el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Incorporated, Palo Alto, CA) y el software Degradometer versión 1.41 (Worldwide Web: dnaarrays.org). Estos resultados experimentales ayudarán a distinguir las rutas moleculares perturbadas como consecuencia de la presencia de tumores.

Análisis de experimentos con micromatrices

El análisis de los datos de expresión molecular a gran escala/alto rendimiento generados dependerá en gran medida de la capacidad de (i) identificar genes expresados diferencialmente en células fagocíticas con un contenido de AND > 2 , (ii) anotar los genes identificados, y (iii) asignar los genes anotados a aquellos específicamente expresados por un tumor específico. El análisis estadístico de los datos de micromatrices se puede hacer, por ejemplo, utilizando el paquete dChip que se adapta fácilmente a este tipo de construcción de listas de genes en su menú "Análisis/Comparar muestras". Al utilizar Affymetrix GeneChips, se aplicarán uno o más Chips de genes y métodos asociados para determinar la calidad de los datos de micromatrices en bruto (Gautier et al. (2004) *Bioinformatics* 20: 307). Además, se utilizarán diversos procedimientos de normalización y corrección de fondo para llegar a un protocolo óptimo para la normalización y el resumen de los conjuntos de sondas (para producir valores de expresión) (Huber et al. (2002) *Bioinformatics* 18 (Suppl. 1): S96; Wu et al. (2004) *Journal of the American Statistical Association* 99: 909; Seo and Hoffman (2006) *BioMed Central Bioinformatics* 7: 395). En una metodología de filtración de dos pasos, compararemos los perfiles de genes de $P_n = 2$ con los de $P_n > 2$ y construiremos una lista de genes expresados y luego compararemos estos genes con los genes específicos de tumores identificados para cada línea de células tumorales: filtración del perfil del gen $P_n = 2$ como se muestra en la Figura 5. Por ejemplo, (i) se obtendrá sangre de pacientes con cáncer de mama; (ii) se aislarán neutrófilos ($n > 2$ y $n = 2$) y se determinarán sus perfiles de genes por triplicado; (iii) la media (de las 3 muestras) de cada gen identificado y su error estándar respectivo (SE) se calculará para cada grupo ($N_n > 2$ y $N_n = 2$); (iv) se compararán los perfiles de expresión génica de los dos grupos y se identificará una lista (L-1) de genes expresados sobre la base de un cambio de registro absoluto > 2 veces ($N_n > 2/N_n = 2$), de acuerdo con la prueba t de Welch modificada de dos muestras; (v) se compararán los perfiles de expresión génica de $N_n = 2$ y del cáncer de mama (obtenido de biopsias de tumor y de tejido mamario normal) y se identificará una lista (L-2) de genes expresados; y (vi) los distintivos genéticos específicos del cáncer de mama que se han adquirido/expresado por $N_n > 2$ se identificarán mediante la comparación de los genes en L-1 y L-2 (dChip "Análisis/Comparar muestras/Comparaciones combinadas) y filtrando genes comunes.

Perfilación de proteínas

Se desnaturalizarán y se reducirán de cincuenta a cien microgramos de la proteína total de cada tipo de células con tris-(2-carboxietil)fosfotripsina (1 mM) y dodecilsulfato de sodio al 0.02% a 60°C durante 1 hora. Las cisteínas se bloquean posteriormente y la proteína total se digiere con tripsina a 37°C durante 12-16 horas. Los péptidos resultantes serán marcados con iTRAQ (con las etiquetas 113-119 y 121) durante 1 hora (cuádruplex u óctuplex dependiendo del número de tipos de células que se comparen). Después del etiquetado, las muestras etiquetadas por separado se combinan y se inyectan en un sistema de HPLC serie Agilent 1200 equipado con una columna de intercambio catiónico fuerte (Applied Biosystems 4.6 x 100 porosa). Las 96 fracciones recogidas se agrupan luego en 14 fracciones, y cada fracción se inyecta en el sistema de HPLC LC Packing Ultimate para una segunda ronda de fraccionamiento bajo condiciones de fase inversa (LC Packings 15 cm x 75 µm columna analítica). Las fracciones de fase inversa se dividen directamente en la placa objetivo utilizando un LC Packings Probot y se analizan con espectrometría de masas (Applied Biosystems 4800 Plus Proteomics Analyzer). Tras la adquisición de datos, los espectros se procesan utilizando el paquete de software ProteinPilot (Applied Biosystems MDS Sciex), y las proteínas individuales en cada uno de los tipos de células con sus niveles de expresión relativa se identifican utilizando el software ProteinPilot™ (el análisis e identificación de los distintivos proteómicos asociados con cáncer será similar al descrito en la Figura 5 para los distintivos genómicos).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar la presencia de una célula cancerosa en un individuo que comprende los pasos de: obtener un primer perfil de expresión de una célula fagocítica sanguínea de un individuo; obtener un segundo perfil de expresión a partir de una célula no fagocítica en sangre del individuo; comparar el primer y segundo perfil de expresión; identificar la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos del primer perfil de expresión en comparación con el segundo perfil de expresión, siendo el uno o más marcadores específicos para la presencia de una célula cancerosa en el individuo; y relacionar la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos del primer perfil de expresión con la presencia de una célula cancerosa en el individuo.
2. Un método *in vitro* para detectar la presencia de una célula cancerosa que comprende las etapas de: obtener un primer perfil de expresión a partir de una célula fagocítica sanguínea de un individuo; obtener un segundo perfil de expresión a partir de una célula no fagocítica en sangre del individuo; comparar el primer y segundo perfil de expresión; identificar la expresión diferencial de uno o más marcadores en el primer perfil de expresión en comparación con el segundo perfil de expresión, siendo uno o más marcadores específicos para la presencia de una célula tumoral circulante o un fragmento subcelular de la misma específico para el primer perfil de expresión; y relacionar la presencia de una célula tumoral circulante o un fragmento subcelular de la misma con la presencia de una célula cancerosa en el individuo.
3. El método de la reivindicación 2, en donde un aumento en la cantidad de un marcador en el primer perfil de expresión con relación al segundo perfil de expresión indica la presencia de una o ambas de una célula tumoral circulante y un fragmento subcelular de la misma.
4. Un método *in vitro* para detectar la presencia de una célula cancerosa en un individuo que comprende los pasos de: aislar una población de células fagocíticas de un individuo; separar $2n$ células fagocíticas de $>2n$ células fagocíticas; obtener un primer perfil de expresión a partir de las células fagocíticas $2n$; obtener un segundo perfil de expresión a partir de las células fagocíticas $>2n$; comparar el primer y segundo perfil de expresión; identificar la expresión diferencial de uno o más marcadores específicos del primer perfil de expresión en comparación con el segundo perfil de expresión, siendo el uno o más marcadores específicos para la presencia de una célula cancerosa en el individuo; y relacionar la expresión diferencial de uno o más marcadores con la presencia de una célula cancerosa en el individuo.
5. El método de la reivindicación 1, 2 o 4, en donde uno o más marcadores se seleccionan del grupo que consiste en ADN, ARN, proteína y combinaciones de los mismos para detectar o identificar la presencia de una célula cancerosa.
6. El método de la reivindicación 1 o 4 para detectar la presencia de una célula cancerosa, en donde la célula fagocítica sanguínea se selecciona del grupo que consiste en uno o más de un neutrófilo, un macrófago, un monocito, una célula dendrítica y una célula espumosa.
7. El método de la reivindicación 1, para detectar la presencia de una célula cancerosa en donde la célula no fagocítica de la sangre se selecciona del grupo que consiste en una o más de una célula T, una célula B, una célula nula y un basófilo.
8. El método de la reivindicación 1 para detectar la presencia de una célula cancerosa en donde la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea son aisladas de sangre entera, orina, heces, saliva, linfa o fluido cerebroespinal o de la reivindicación 4 para detectar la presencia de una célula cancerosa, en donde la célula fagocítica sanguínea se aísla de sangre entera, orina, heces, saliva, linfa o líquido cefalorraquídeo.
9. El método de la reivindicación 1 para detectar la presencia de una célula cancerosa en la que la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea se aíslan de una población de glóbulos blancos.
10. El método de la reivindicación 8 o 9 para detectar la presencia de una célula cancerosa, en donde la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea se aíslan usando anticuerpos, o el método de la reivindicación 4 en donde la célula fagocítica sanguínea se aísla usando anticuerpos.
11. El método de la reivindicación 8 o 9 para detectar la presencia de una célula cancerosa, en donde la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea son separadas por uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en clasificación de células activadas por fluorescencia, filtración por gradiente basado en centrifugación, elución y microfluidos, o el método de la reivindicación 4 en donde la célula fagocítica sanguínea se separa usando uno o más métodos seleccionados del grupo que consiste en clasificación celular activada por fluorescencia, filtración, centrifugación basada en gradiente, elución y por microfluido.
12. El método de la reivindicación 8 o 9, para detectar la presencia de una célula cancerosa en donde la célula fagocítica sanguínea y la célula no fagocítica sanguínea se separan usando un ligando que se une a un receptor molecular expresado en las membranas plasmáticas de poblaciones de glóbulos blancos, o el método de la reivindicación 4 para detectar la presencia de una célula cancerosa, en donde la célula fagocítica sanguínea se

separa usando un ligando que se une a un receptor molecular expresado en las membranas plasmáticas de poblaciones de glóbulos blancos.

- 5 13. El método de la reivindicación 1 o 2, para detectar la presencia de una célula cancerosa en donde el marcador se selecciona de uno o más de ADN, ARN y microARN correspondientes a uno o más de un gen cancerígeno, un oncógeno y un gen supresor tumoral, o de la reivindicación 1 para identificar un distintivo específico de tumor en donde los dos o más marcadores son ADN o ARN correspondientes a dos o más genes cancerígenos, oncógenos, genes supresores de tumores o combinaciones de los mismos o de la reivindicación 4 para detectar la presencia de una célula cancerosa seleccionándose el uno o más marcadores del grupo que consiste en ADN, ARN, microARN y
- 10 combinaciones de los mismos correspondientes a dos o más genes de cáncer, oncogenes, genes supresores de tumores o cualquier combinación de los mismos.
- 15 14. El método de la reivindicación 1 o 2 para detectar la presencia de una célula cancerosa, en donde el marcador es uno o ambos de una proteína y un polipéptido codificado por uno o más de un gen de cáncer, un oncógeno y un gen supresor de tumor, o el método de la reivindicación 1 para identificar un distintivo específico de tumor en donde los dos o más marcadores son proteínas o polipéptidos codificados por dos o más genes cancerígenos, oncógenos, genes supresores de tumores o combinaciones de los mismos.
- 15 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el individuo tiene uno o más de cáncer oculto, cáncer primario previamente diagnosticado y cáncer metastásico.

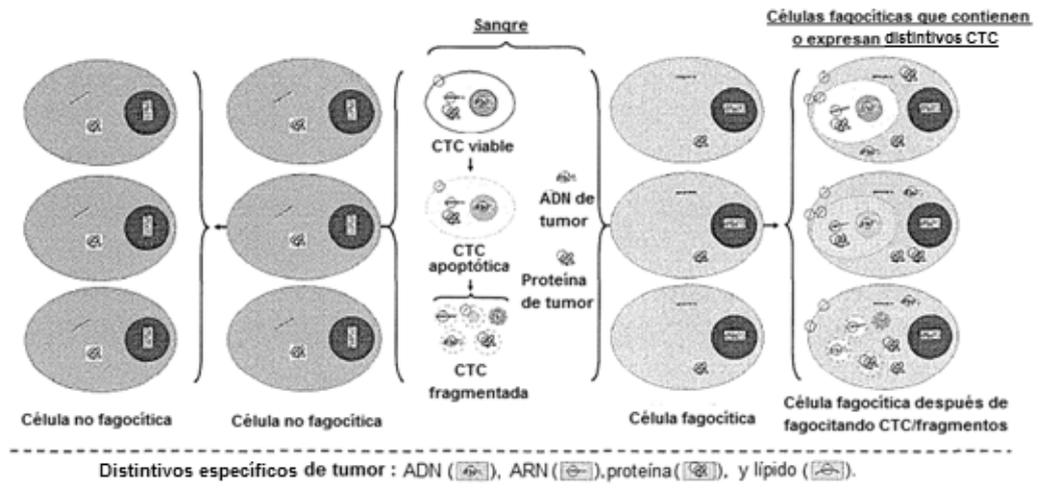


Figura 1

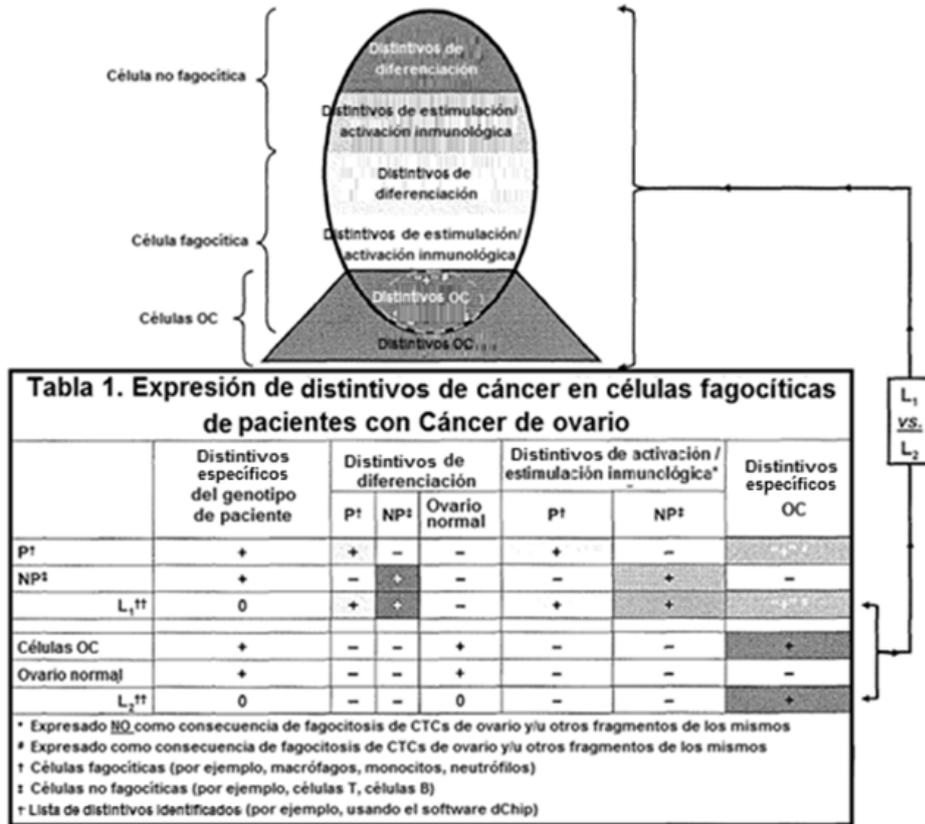


Figura 2

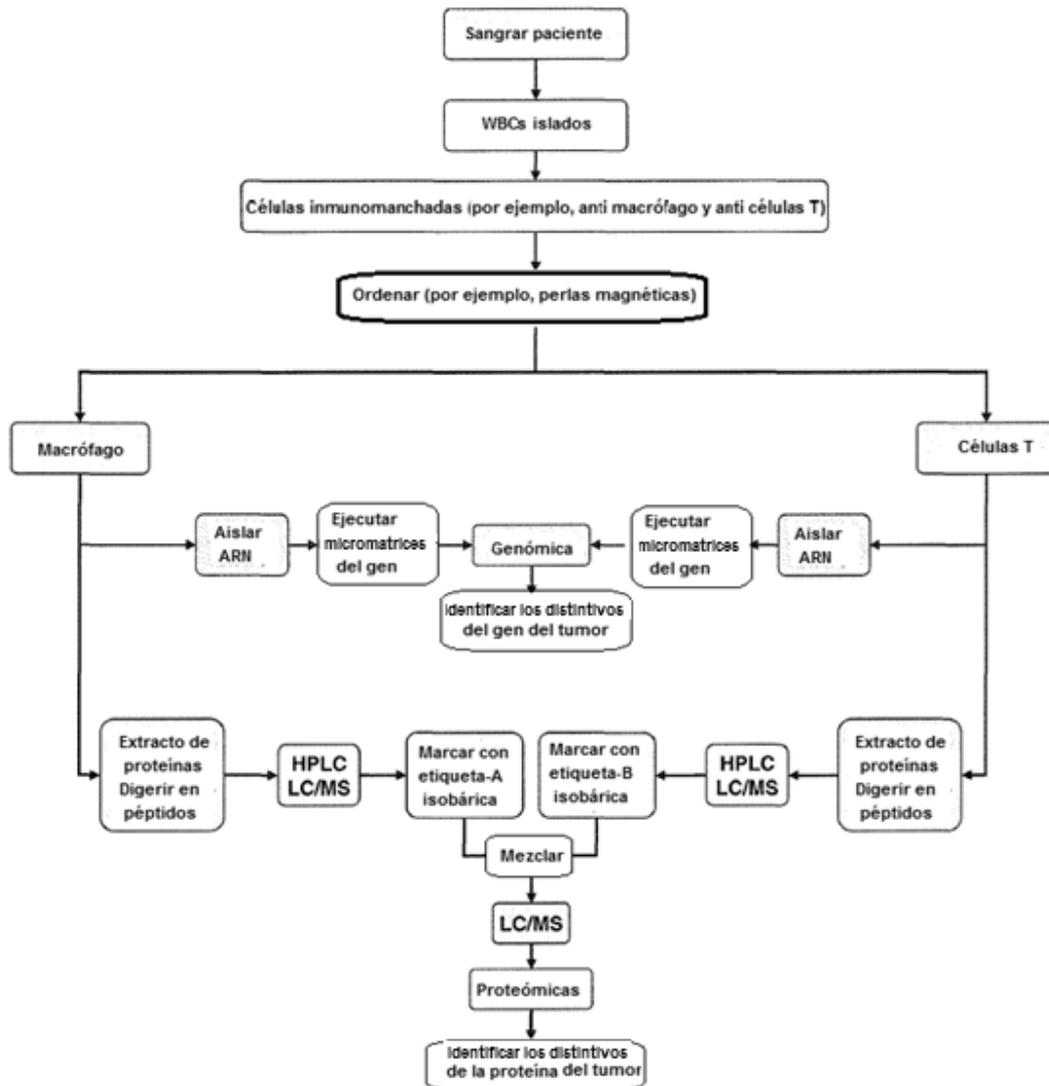


Figura 3

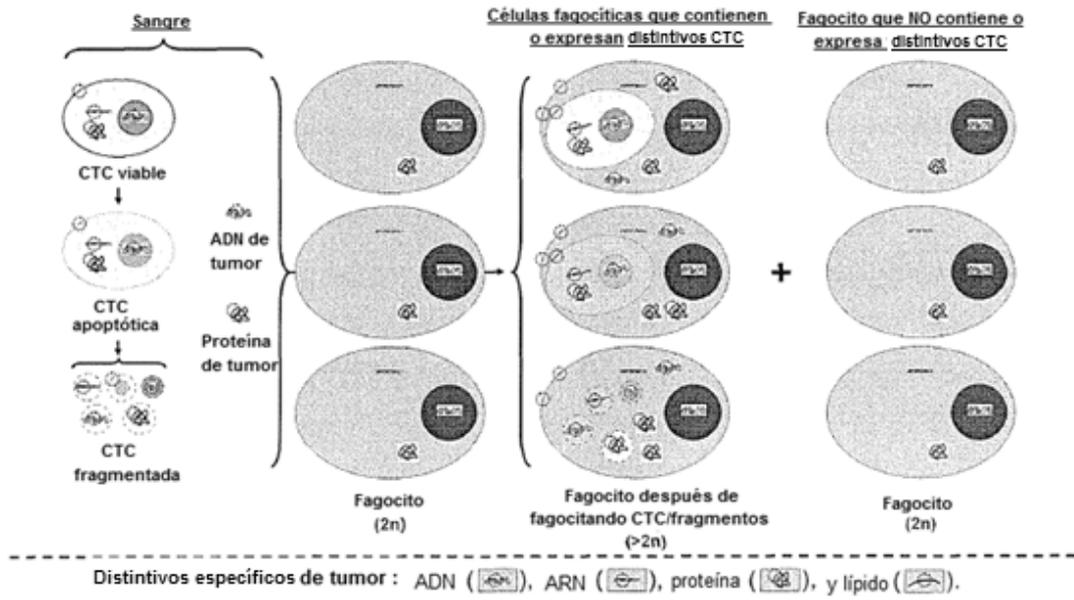


Figura 4

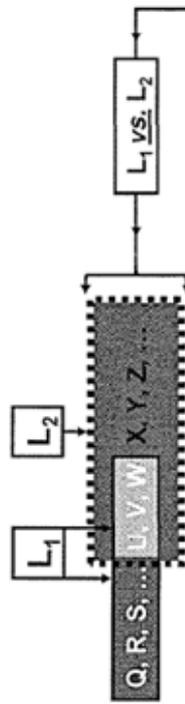


Tabla 2. Identificación de los distintivos de cáncer adquiridos por células fagocíticas de ratones que tienen BC

| Célula | Contenido de ADN | Distintivos con genotipo normal de célula de ratón | Distintivos de diferenciación | | Estimulación inmunológica de macrófago/células de activación | | Distintivos específicos de BC | |
|------------------|------------------|--|-------------------------------|--------------|--|-----------------------------|--------------------------------|--|
| | | | Macrófago | Mama normal | No consecuencia de fagocitosis | Consecuencia de fagocitosis | No consecuencia de fagocitosis | Consecuencia de fagocitosis [#] |
| Macrófagos | >2n | A, B, C, ... | E, F, G, ... | NA** | M, N, O, ... | Q, R, S, ... | NA | U, V, W |
| | 2n | A, B, C, ... | E, F, G, ... | NA | M, N, O, ... | — | NA | — |
| L ₁ * | | 0 | 0 | 0 | 0 | Q, R, S, ... | 0 | U, V, W |
| Células BC | ≥2n | A, B, C, ... | NA | I, J, K, ... | NA | NA | U, V, W, X, Y, Z, ... | NA |
| Mama normal | 2n | A, B, C, ... | NA | I, J, K, ... | NA | NA | — | NA |
| L ₂ * | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | U, V, W, X, Y, Z, ... | 0 |

* Lista de distintivos identificados siguiendo el perfil genómico
 ** No aplicable
 † Expresada como consecuencia de fagocitosis de distintas CTCs de mama y/o fragmentos de los mismos
 # Expresada como consecuencia de fagocitosis de CTCs de mama y/o fragmentos de los mismos

Figura 5

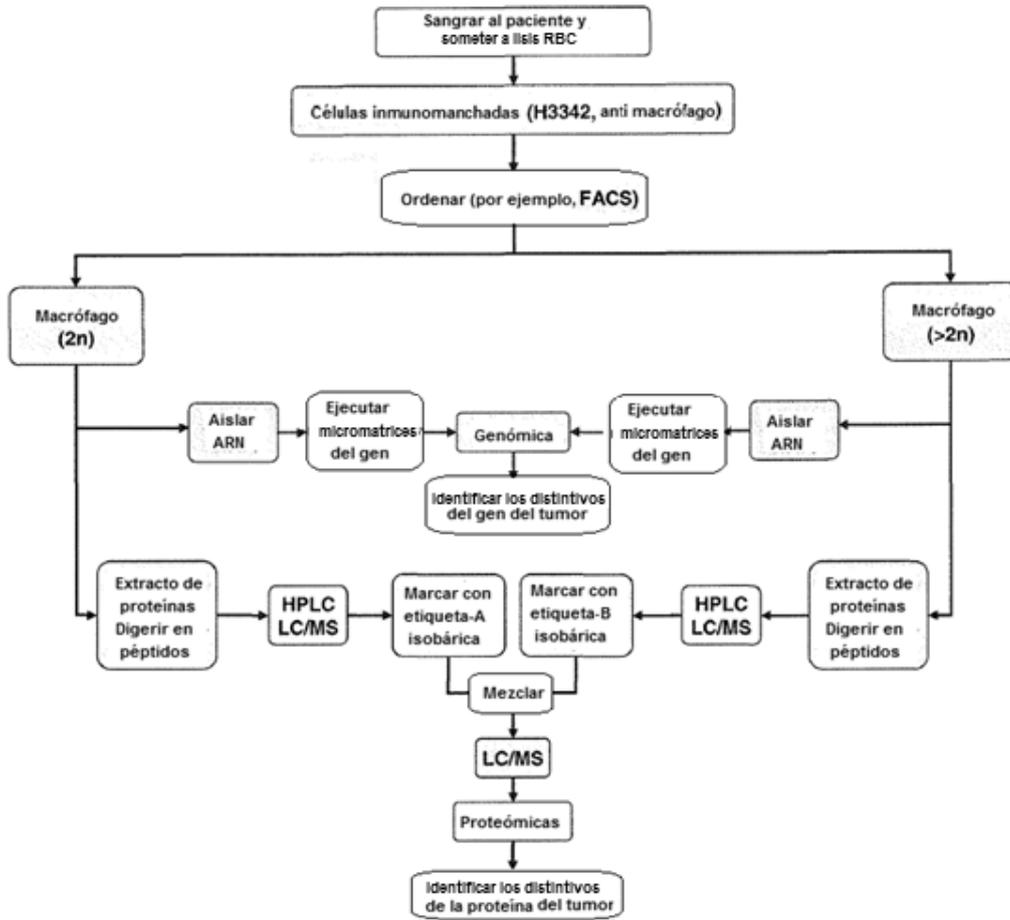


Figura 6

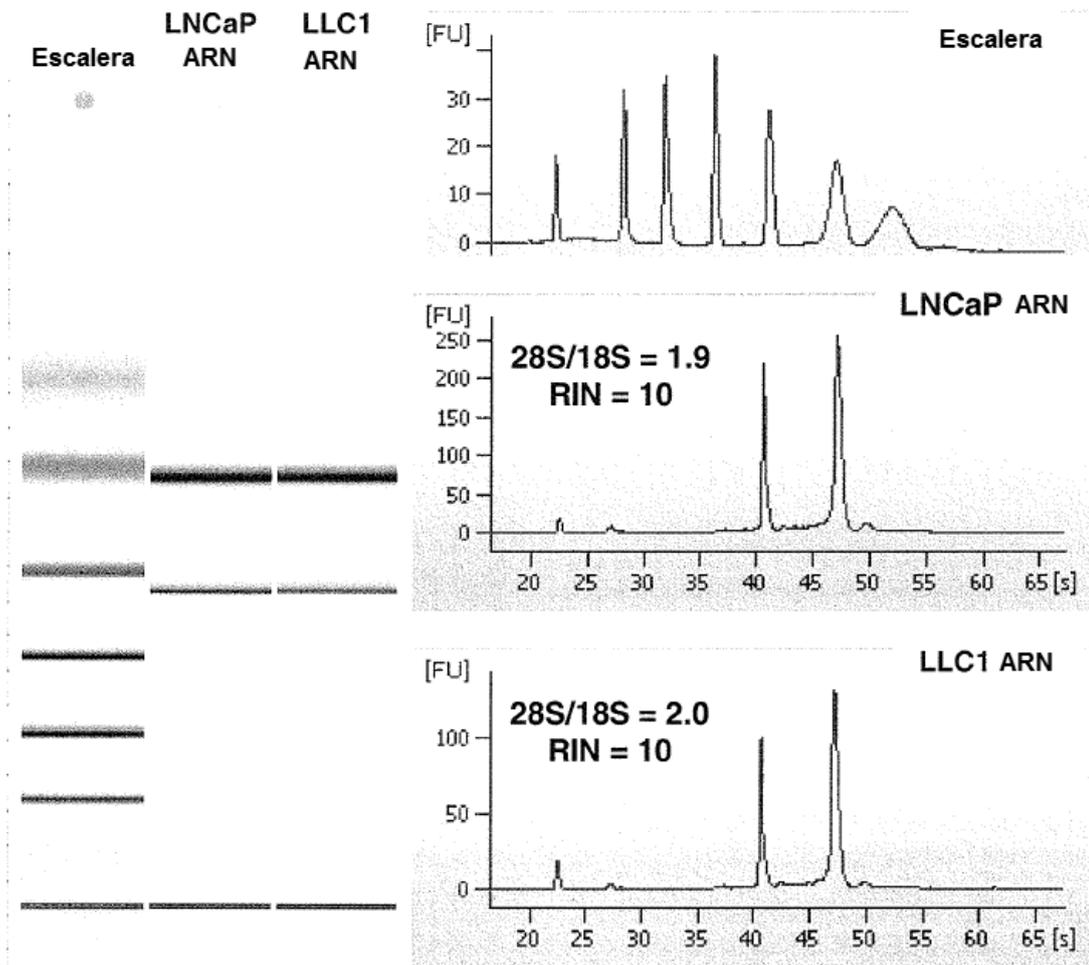


Figura 7

Tabla 3. Rendimiento y calidad del ARN obtenido de WBC de ratón

| | Rendimiento (μg) | Proporción 28S/18S | Número de integridad de ARN (RIN) |
|---------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Macrófago* | 0.53 \pm 0.22 | 1.9 \pm 0.2 | 9.4 \pm 0.8 |
| Células T* | 0.42 \pm 0.20 | 1.9 \pm 0.3 | 8.4 \pm 0.9 |
| Neutrófilos* | 0.62 \pm 0.16 | 1.9 \pm 0.3 | 9.6 \pm 0.7 |

*Media de = 6 preparaciones celulares cada una.

Figura 8

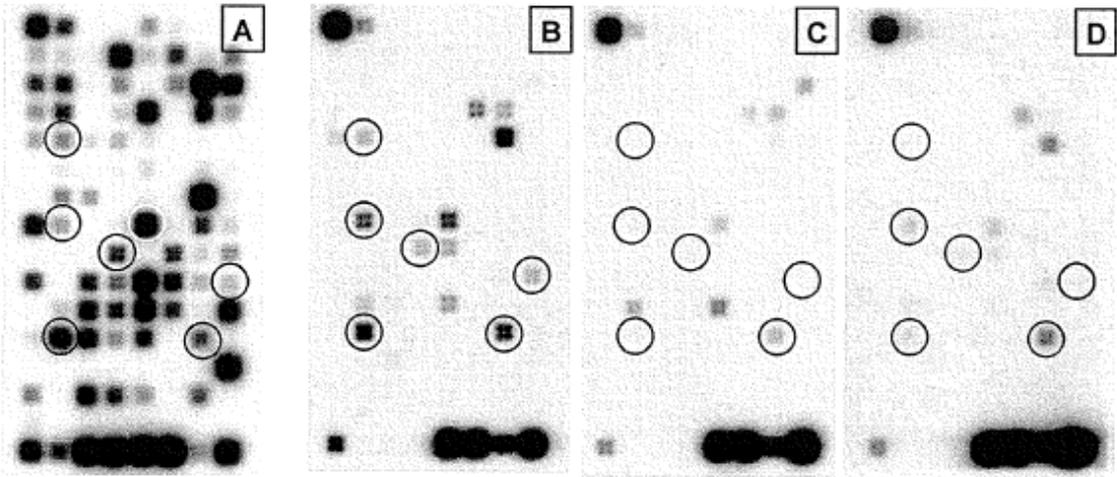


Figura 9

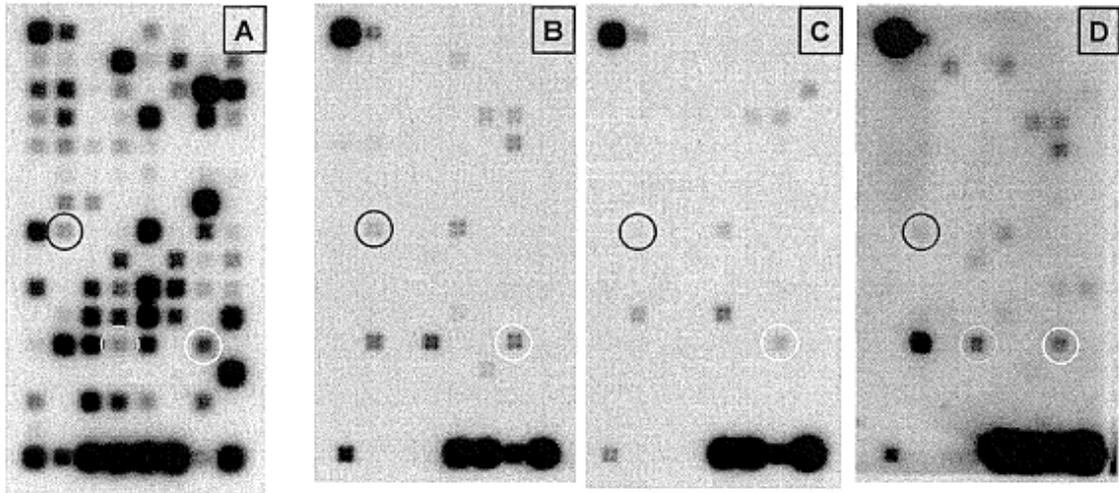


Figura 10

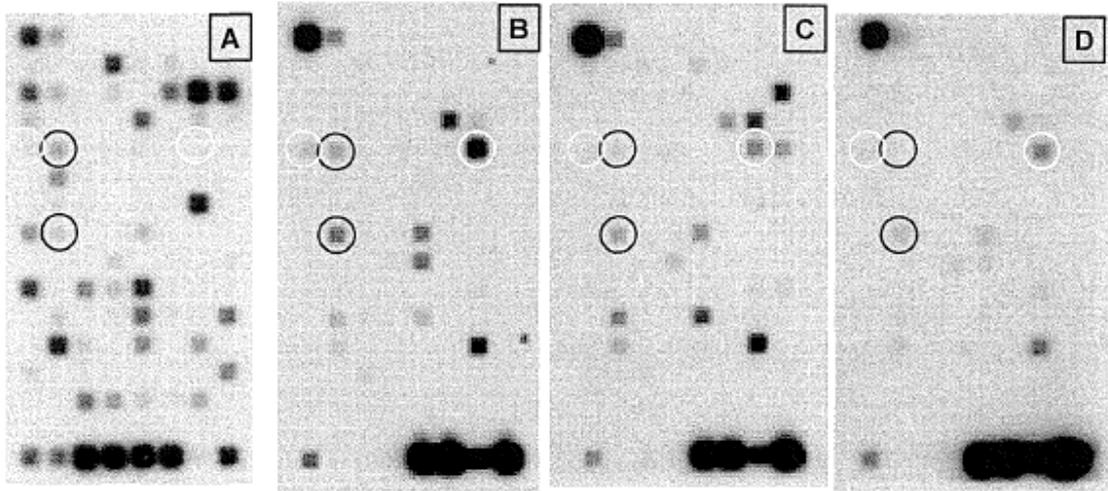


Figura 11

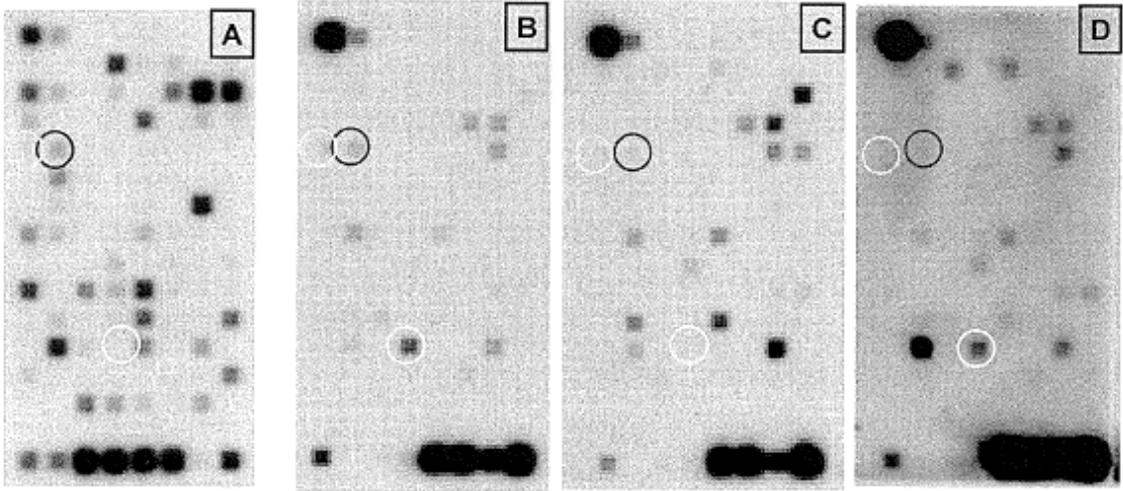


Figura 12

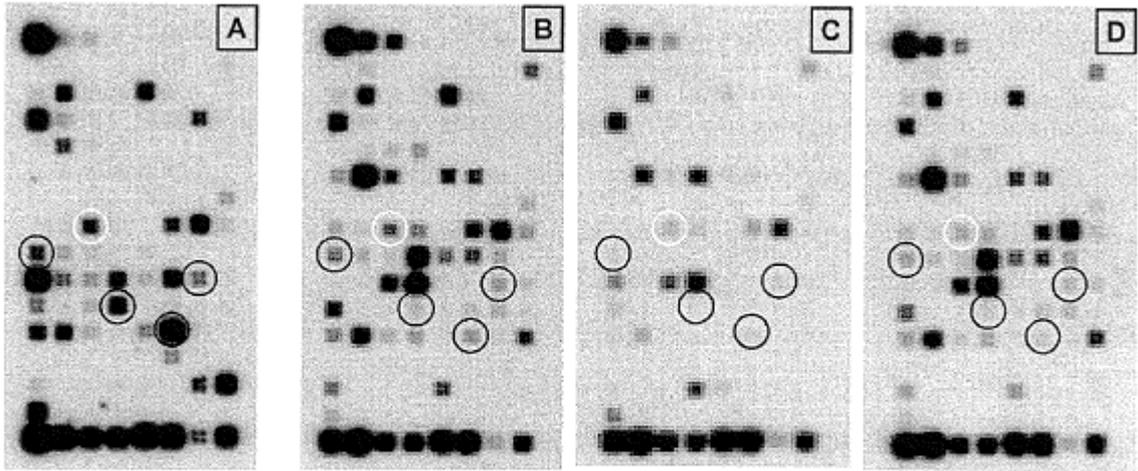


Figura 13

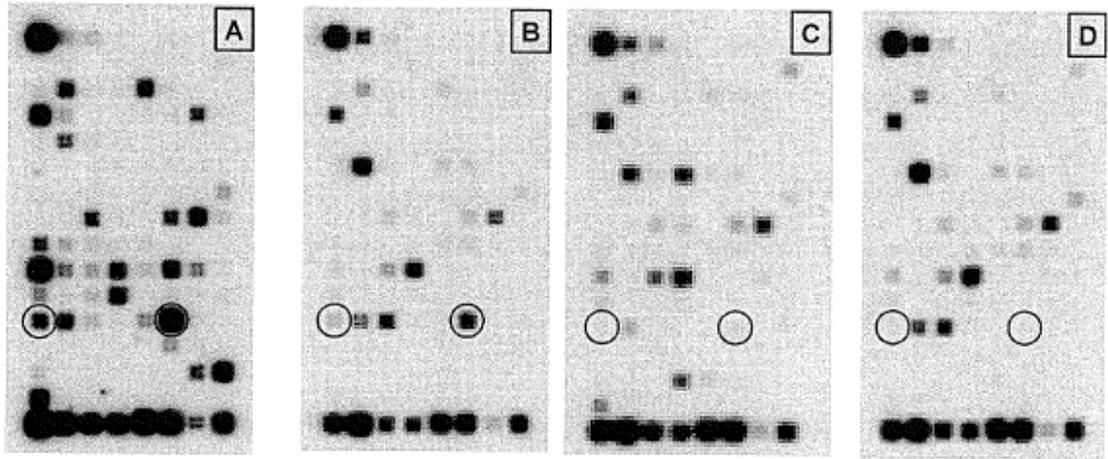


Figura 14

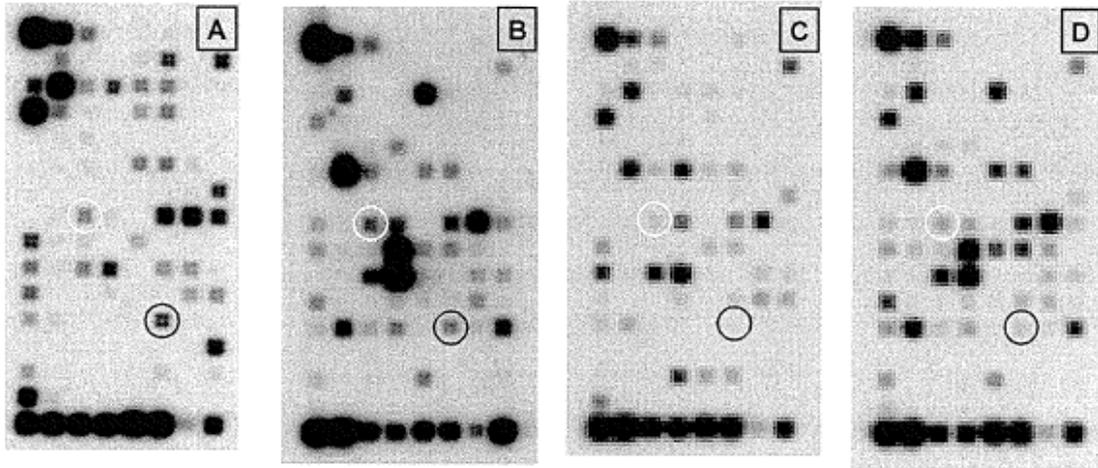


Figura 15

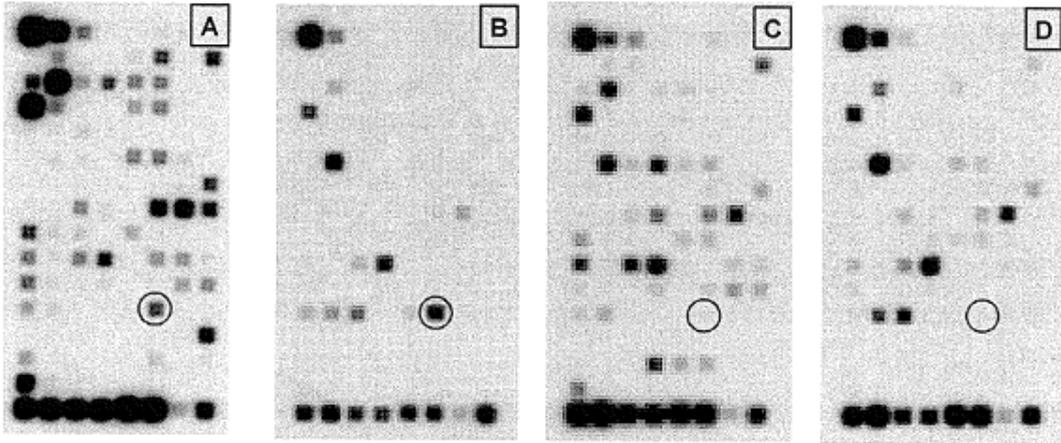


Figura 16

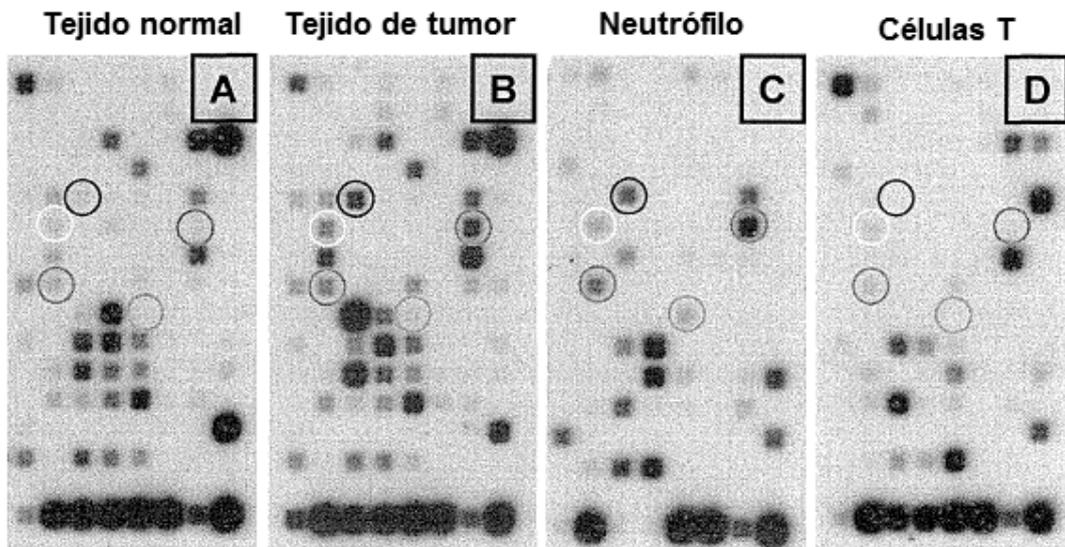


Figura 17

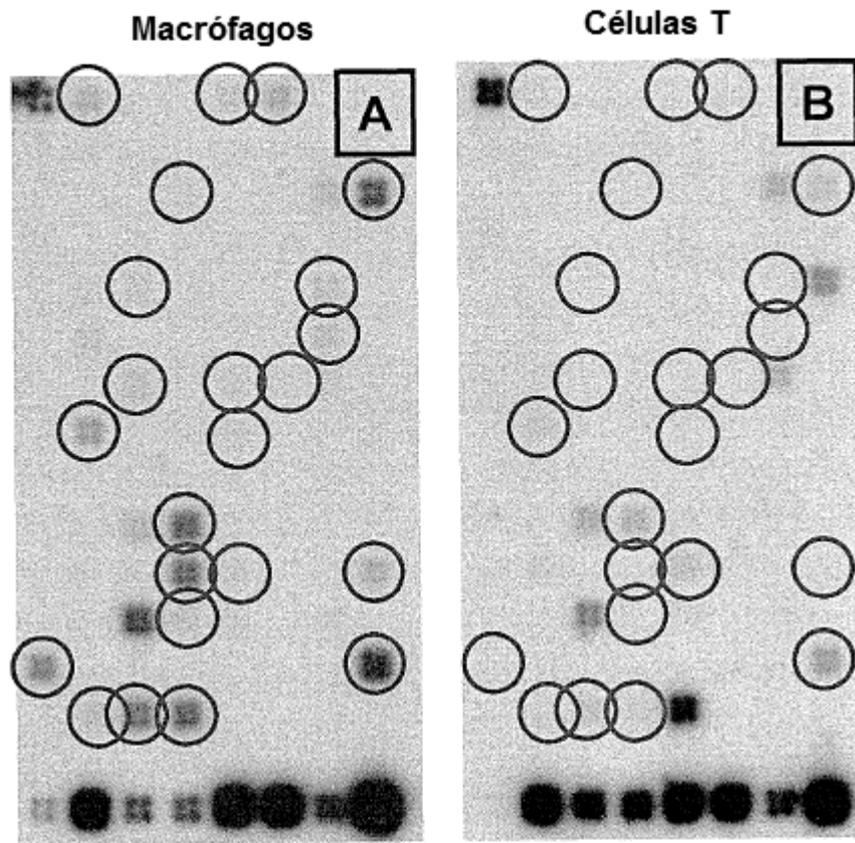


Figura 18

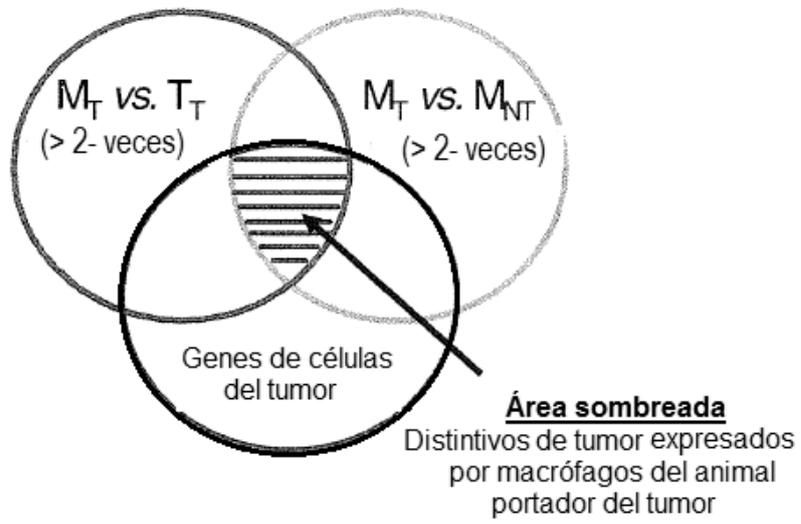


Figura 19

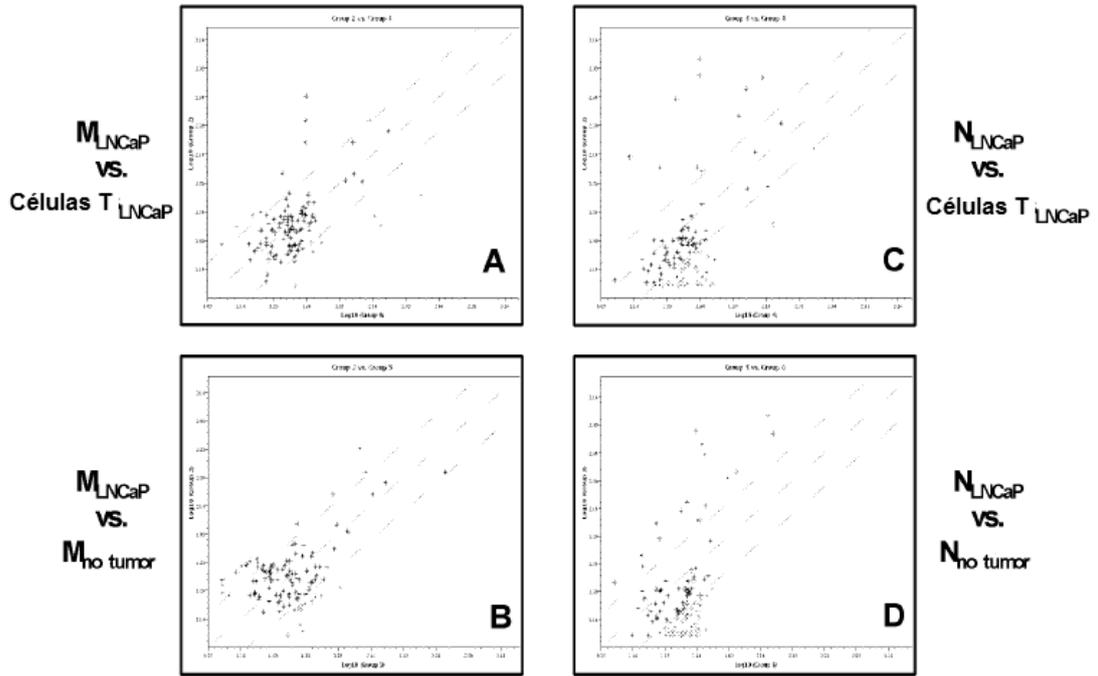


Figura 20

| Tabla 5. Expresión de genes relacionados con cáncer dentro neutrófilos fagocíticos (N) y macrófagos (M). | | | | | | | | | |
|---|---|----------|---|----------|---|----------|--|----------|----------|
| Genes sobre expresados | LNCaP (Ca. de próstata humano (ratones desnudos)) | | LS174T (Ca. de colon humano (ratones desnudos)) | | B16F10 (Melanoma de ratón (ratones negros)) | | LLC1 (Ca. de pulmón de ratón (ratones negros)) | | |
| | M | N | M | N | M | N | M | N | |
| BAK1 | - | - | - | - | + | + | - | - | |
| EGFR | - | - | + | + | - | - | - | - | |
| ERBB2 | - | + | + | + | - | - | - | - | |
| FOS | - | - | - | + | - | - | - | - | |
| JUN | + | + | - | + | - | - | - | + | |
| MAP2K1 | - | + | - | - | - | - | - | - | |
| Mdm2 | | | | | | | | + | |
| MMP2 | - | + | - | - | - | - | - | - | |
| PDGFB | - | + | - | - | - | - | - | + | |
| Plaur | | | | | | | | + | |
| RB1 | - | + | - | - | - | - | + | - | |
| SNCG | + | + | - | - | - | - | - | - | |
| SERPINB2 | + | - | + | - | - | - | - | - | |
| SPP1 | - | - | - | - | - | + | + | + | |
| Total | 12 | 3 | 7 | 3 | 4 | 1 | 2 | 2 | 5 |
| Genes sobreexpresados en fagocitos (M+N): | | 8 | | 5 | | 2 | | 6 | |
| Rojo = oncogenes; azul = genes específicos de tumor; y negro = genes relacionados con el tumor. ■ = gen adquirido/expresado simultáneamente por M y N. | | | | | | | | | |

Figura 21

Tabla 6. Genes relacionados con cáncer regulados corriente arriba (>2- veces) en macrófagos de paciente con cáncer de ovario

| <i>Símbolo del Gen</i> | <i>Macrófagos/células T</i> |
|------------------------|-----------------------------|
| <i>AKT1*</i> | 4.62 |
| <i>APAF1</i> | 4.95 |
| <i>ATM</i> | 5.26 |
| <i>CDC25A</i> | 2.01 |
| <i>CDKN1A</i> | 4.57 |
| <i>ETS2</i> | 3.47 |
| <i>FOS</i> | 6.49 |
| <i>IL8</i> | 3.62 |
| <i>ITGA4</i> | 6.58 |
| <i>ITGA6</i> | 3.53 |
| <i>ITGAV</i> | 2.50 |
| <i>JUN</i> | 3.01 |
| <i>MAP2K1</i> | 3.09 |
| <i>NFKBIA</i> | 2.77 |
| <i>PLAU</i> | 2.13 |
| <i>PLAUR</i> | 38.79 |
| <i>RAF1</i> | 8.13 |
| <i>SERPINB2</i> | 5.37 |
| <i>SYK</i> | 20.81 |
| <i>TIMP1</i> | 2.04 |
| <i>TNF</i> | 3.75 |
| <i>TNFRSF10B</i> | 3.67 |
| <i>TNFRSF1A</i> | 6.96 |

* = oncogen

Figura 22

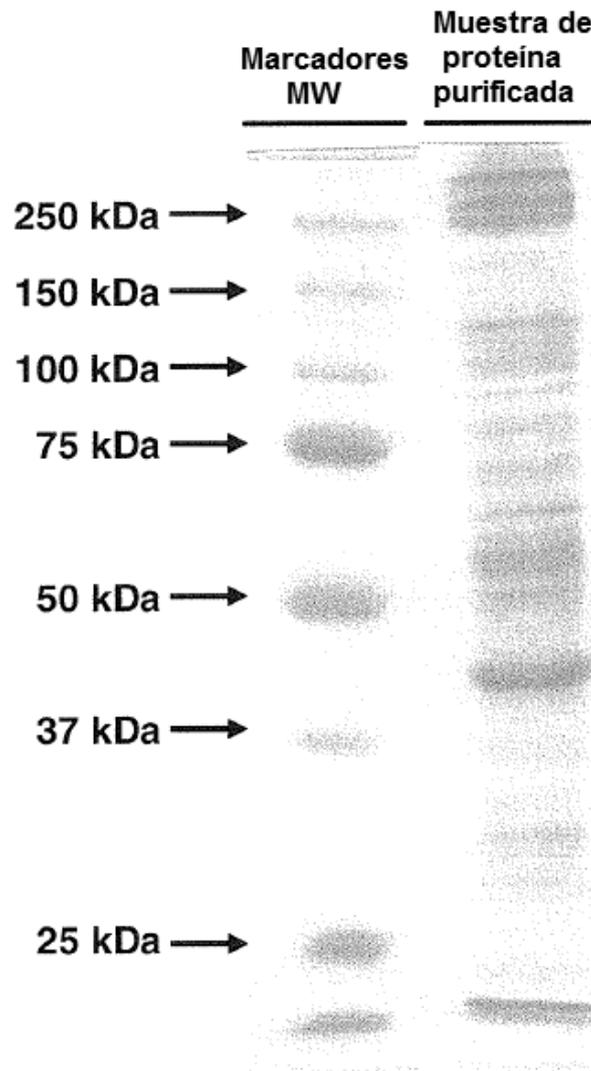


Figura 23

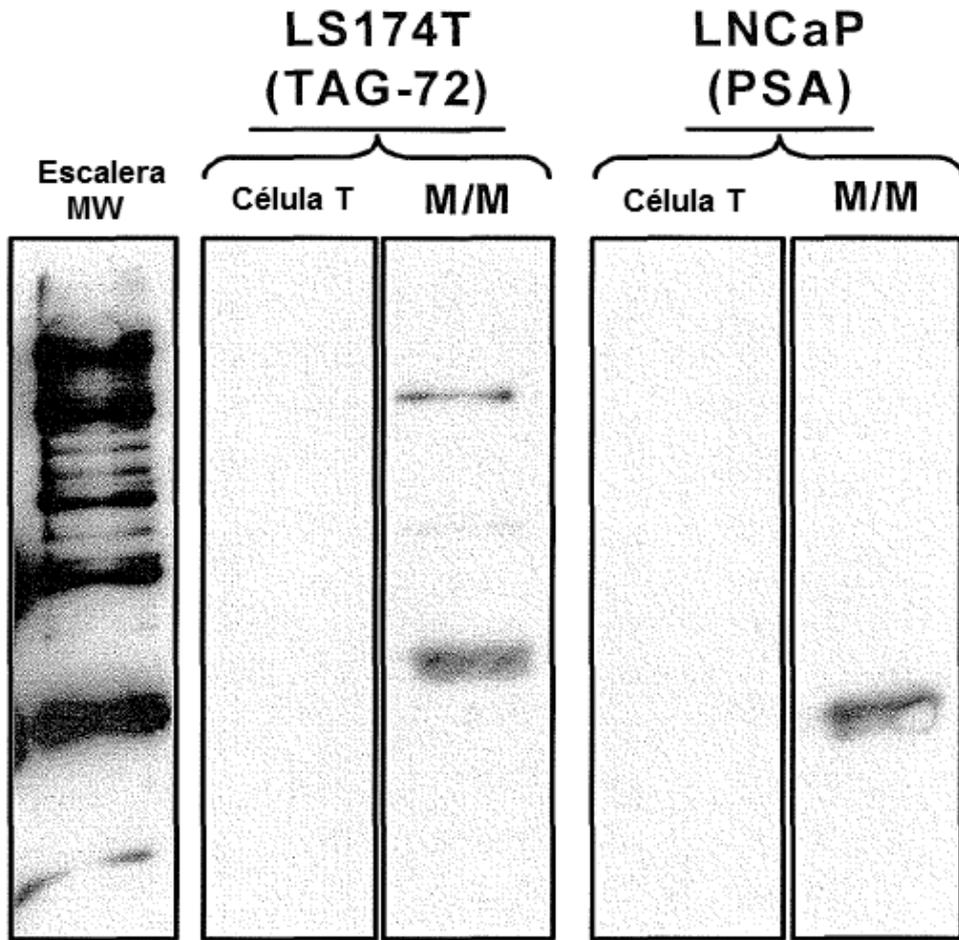


Figura 24