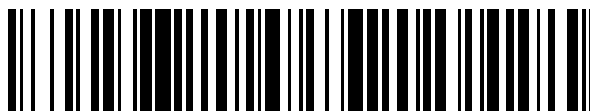


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 362**

51 Int. Cl.:

C07K 17/04 (2006.01)
G01N 33/554 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61B 10/02 (2006.01)
A61B 5/15 (2006.01)
G01N 33/549 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61B 10/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011 PCT/CA2011/000423**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11127585**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011 E 11768325 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2558502**

54 Título: **Microvesículas obtenidas a partir de células tumorales**

30 Prioridad:

13.04.2010 US 759378

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2018

73 Titular/es:

**THE ROYAL INSTITUTION FOR THE
 ADVANCEMENT OF LEARNING / MCGILL
 UNIVERSITY (50.0%)
 845 Sherbrooke Street, West
 Montréal, Québec H3A 2T5, CA y
 THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RAK, JANUSZ;
 AL-NEDAWI, KHALID;
 MEEHAN, BRIAN y
 GUHA, ABHIJIT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 683 362 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

Microvesículas obtenidas a partir de células tumorales

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para supervisar la progresión de un cáncer y/o la eficacia terapéutica de un tratamiento anticancerígeno en una muestra de un sujeto mediante la detección de proteínas oncogénicas y/o mediadores moleculares de su actividad transformadora en microvesículas.

Antecedentes de la invención

10 La transformación de una célula normal en una célula maligna produce como resultado, entre otras cosas, la proliferación incontrolada de las células de la progenie, que muestran una morfología indiferenciada, inmadura, una supervivencia exagerada y propiedades proangiogénicas y una expresión, sobreexpresión o activación constitutiva de oncogenes que normalmente no se expresan de esa forma en las células normales, maduras.

15 Las mutaciones oncogénicas y las perturbaciones intrínsecas resultantes en la señalización celular se consideran eventos que causan el desarrollo del cáncer. Por ejemplo, un crecimiento agresivo de los tumores cerebrales humanos (gliomas) se asocia frecuentemente con una sobreexpresión y una amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y su mutante truncado independiente de ligando, conocido como EGFRvIII (Cavenee, 2002, Carcinogenesis, 23: 683-686). La activación persistente de este receptor oncogénico desencadena una activación anormal de las rutas de señalización transformantes, los mecanismos de regulación y, en última instancia, la expresión de genes implicados en la proliferación celular, la supervivencia y la angiogénesis.

20 Se conocen muchas mutaciones genéticas que dan lugar a la activación de oncogenes y, de ese modo, aumentan la probabilidad de que una célula normal se convierta en una célula tumoral. Además, la inactivación de genes supresores tumorales, que actúan normalmente para contrarrestar a los oncogenes mediante una reparación del daño en el ADN, o mediante la inducción de una apoptosis de las células dañadas y que conservan las actividades celulares bajo control, también puede conducir al cáncer. Existen muchas pruebas que apoyan la idea de que una activación de los oncogenes o una inactivación de los supresores tumorales puede conducir al cáncer (Hanahan y Weinberg, 2000, Cell, 100: 57-70). Las mutaciones de proto-oncogenes en las células somáticas son cada vez más reconocidas como significativas en el inicio de cánceres humanos. Algunos ejemplos de oncogenes formados por tales mutaciones incluyen: neu, fes, fos, myc, myb, fms, Ha-ras y Ki-ras. Queda mucho por aprender con el fin de entender cómo actúan los oncogenes y sus productos de expresión para transformar células normales en células cancerosas.

30 Los factores de crecimiento y sus receptores están implicados en la regulación de la proliferación celular y también parecen tener un papel clave en la oncogénesis. Por ejemplo, los tres siguientes proto-oncogenes están relacionados con un factor de crecimiento o un receptor de factor de crecimiento: 1) c-sis, que es homólogo al gen transformante del virus del sarcoma de simio y es la cadena B del factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas (PDGF); 2) c-fms, que es homólogo al gen transformante del virus de sarcoma felino y está estrechamente relacionado con el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1 R); y 3) c-erbB, que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y es homólogo al gen transformante del virus de la eritroblastosis aviar (v-erbB). Los dos proto-oncogenes relacionados con un receptor, c-fms y c-erbB, son miembros de la familia de proteínas cinasas específicas de tirosina, a la cual pertenecen muchos proto-oncogenes.

40 Además, un crecimiento agresivo de los tumores cerebrales humanos (gliomas) se asocia frecuentemente con una sobreexpresión y una amplificación de EGFR y su mutante truncado independiente de ligando, conocido como EGFRvIII. La activación persistente de este receptor oncogénico desencadena una expresión anormal de genes implicados en la proliferación celular, la supervivencia y la angiogénesis.

45 Diversos grupos han investigado la expresión de EGFR en una variedad de tumores utilizando métodos inmunohistoquímicos cuantitativos, así como semicuantitativos. Los tipos de tumores investigados incluyen carcinomas ginecológicos, de vejiga, cabeza y cuello, pulmón, colorrectales, pancreáticos y de mama. Tales estudios se basan casi exclusivamente en una metodología de unión a radioligando o un inmunorreconocimiento para la cuantificación de EGFR en muestras de tejido.

50 Las correlaciones más extensas de la expresión de EGFR con datos clínicos se han llevado a cabo en estudios con pacientes con cáncer de mama que datan de hace varias décadas (por ejemplo, Nicholson et al., 1988, Int. J. Cancer, 42: 36-41). En varios estudios con un máximo de 246 pacientes, se ha demostrado que el EGFR es un marcador muy importante de un pronóstico malo para el cáncer de mama. Está considerado como una de las variables más importantes para predecir una supervivencia exenta de recaída y general en pacientes con ganglios linfáticos negativos y es la segunda variable más importante, después del estado ganglionar, en pacientes con ganglios linfáticos positivos. En general, los tumores positivos para EGFR son más grandes y se producen en una mayor proporción de pacientes con implicación de los ganglios linfáticos. El significado de un pronóstico de EGFR/ErbB1/HER-1 se ve reforzado por una detección simultánea de su receptor oncogénico de tirosina cinasa relacionado y que interacciona, conocido como ErbB2/HER-2/neu, una diana de la herceptina (Citri & Yarden, 2006,

Nature Rev. Mol. Cell. Biol., 7: 505-516).

Los oncogenes mutados son, por lo tanto, marcadores de afecciones malignas o premalignas. También se sabe que otras porciones, no oncogénicas del genoma se pueden alterar en el estado neoplásico. Existe un amplio reconocimiento de la importancia de las pruebas para una detección temprana del cáncer. En algunos casos, las células anormales o malignas exfoliadas desde la superficie de un órgano, se pueden identificar mediante un examen citológico de raspados y fluidos. Por ejemplo, un frotis de PAP (prueba de Papanicolaou) puede detectar células anormales (por ejemplo, pre-cancerosas o cancerosas) del cuello uterino. Alternativamente, anomalías genéticas en las células cancerosas o células pre-cancerosas se pueden detectar utilizando técnicas moleculares. Por ejemplo, técnicas tales como un análisis de la secuencia de ADN o de la metilación se pueden usar para detectar mutaciones específicas y/o alteraciones estructurales, así como epigenéticas en el ADN.

Los ensayos basados en ácido nucleico pueden detectar tanto ADN oncogénico como no oncogénico, ya sea mutado o no mutado, siempre que las células cancerosas o sus residuos celulares relacionados estén directamente disponibles para un análisis (por ejemplo, en material quirúrgico o de biopsia, un lavado, heces o células cancerosas circulantes). En particular, los métodos de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa) permiten la detección de pequeñas cantidades de moléculas mutantes entre un fondo de células normales. Aunque los medios alternativos para detectar pequeñas cantidades de células tumorales (tales como la citometría de flujo) en general se han limitado a neoplasias hematológicas, los ensayos para la amplificación de ácidos nucleicos han probado una sensibilidad y especificidad en la identificación de células malignas y para predecir el pronóstico después de una quimioterapia (Fey et al., 1991, Eur. J. Cancer 27: 89-94).

Se han desarrollado varias estrategias de amplificación de ácidos nucleicos para detectar pequeñas cantidades de moléculas mutantes en tejido tumoral sólido, en particular para el oncogén ras (Chen y Viola, 1991, Anal. Biochem. 195: 51-56). Por ejemplo, un método sensible y específico identifica ADN mutante del oncogén ras basándose en el fallo para escindir un sitio de restricción en el codón 12º que es fundamental (Kahn et al., 1991, Oncogene, 6: 1079-1083). Se pueden aplicar protocolos similares para detectar cualquier región mutada del ADN en una neoplasia, lo que permite la detección de otro ADN que contiene oncogenes o un ADN asociado a un tumor.

Muchos estudios emplean ensayos de amplificación de ácidos nucleicos para analizar la sangre periférica de pacientes con cáncer con el fin de detectar el ADN intracelular extraído a partir de células cancerígenas circulantes, incluyendo un estudio que detectaba el oncogén ras intracelular a partir de células circulantes de cáncer pancreático (Tada et al., 1993, Cancer Res. 53: 2472-4). El ensayo se realiza sobre la fracción celular de la sangre, es decir, el sedimento celular o las células dentro de la sangre completa y la fracción de suero o plasma se ignora o se retira antes del análisis. Puesto que un enfoque de este tipo requiere la presencia de células cancerígenas circulantes metastásicas (para los tumores no hematológicos), tiene un uso clínico limitado en pacientes con cánceres tempranos y no es útil en la detección de neoplasias no invasivas o estados premalignos.

No se ha reconocido en general que los ensayos de amplificación de ácido nucleico puedan detectar el ADN mutado extracelular asociado a un tumor, incluyendo el ADN de un oncogén, en la fracción de plasma o suero de la sangre. Además, no se ha reconocido que esto se puede lograr de una manera clínicamente útil, es decir, rápidamente en un día, o en menos de 8 horas.

La detección de un oncogén mutante mediante un ensayo de amplificación de ácido nucleico, en el plasma o suero sanguíneo periférico, ha sido el objeto de informes de la técnica anterior. Sin embargo, ese método requiere mucho tiempo y enfoques técnicamente exigentes para la extracción de ADN y, por lo tanto, tienen una utilidad clínica limitada.

Las pruebas para detectar proteínas expresadas por ciertos tipos de cáncer se pueden realizar. Por ejemplo, el escrutinio del antígeno prostático específico (PSA) se puede usar para identificar pacientes que tienen riesgo de o que padecen cáncer de próstata. Sin embargo, el escrutinio del PSA puede sufrir por la variabilidad de los métodos de ensayo y la falta de especificidad. Por ejemplo, aunque las células malignas de la próstata producen mayores cantidades de PSA, el PSA no es específico de las células cancerosas, sino que es producido tanto por células normales como cancerosas de la próstata. Los niveles de PSA pueden variar dependiendo de la edad del paciente, la fisiología de la próstata, el grado del cáncer y la sensibilidad de los niveles de PSA frente a agentes farmacológicos. Además, las bases moleculares de muchos tipos de cáncer son aún desconocidas y por lo tanto, las pruebas moleculares aún no son lo suficientemente amplias como para detectar la mayoría de los cánceres.

Por lo tanto, la detección de muchos tipos de cáncer todavía se basa en la detección de una masa anormal en el órgano de interés. En muchos casos, un tumor se detecta frecuentemente solo después de que un tumor maligno está avanzado y puede haber metástasis en otros órganos. Por ejemplo, el cáncer de mama se detecta normalmente mediante la obtención de una biopsia de un bulto detectado por una mamografía o mediante un examen físico de la mama. También, aunque la medición del antígeno prostático específico (PSA) ha mejorado de manera significativa la detección del cáncer de próstata, la confirmación de un cáncer de próstata por lo general requiere la detección de una morfología o textura anormal de la próstata. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos y dispositivos para la detección temprana del cáncer. Estos nuevos métodos podrían, por ejemplo, reemplazar o complementar los ya existentes, reduciendo los márgenes de incertidumbre y ampliando la base para

la toma de decisiones médicas.

5 Como se ha indicado anteriormente, se han utilizado varios métodos para detectar los niveles de EGFR en tejidos tumorales. Sin embargo, hay muchos casos en los que el tejido no está disponible fácilmente o en los que no es deseable o no es posible retirar tejido de una biopsia de los tumores. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica médica de pruebas de diagnóstico rápidas, precisas y fiables, que también sean prácticas y no traumáticas para los pacientes.

10 El documento WO 2009/021322 A1 describe microvesículas obtenidas a partir de células y métodos para diagnosticar o determinar el pronóstico de un cáncer, detectando la presencia de una proteína oncogénica en las microvesículas y midiendo el estado de fosforilación de tal proteína oncogénica en un método para supervisar la eficacia terapéutica de un tratamiento contra el cáncer. El documento, sin embargo, no describe una fosforilación de sitios de aminoácidos específicos que son responsables de diferentes funciones de la molécula y que tienen una importancia biológica específica.

15 El documento GB 2 463 401 A1 describe un método para la caracterización de un fenotipo, o el diagnóstico de enfermedades que comprende la determinación de una biofirma de un exosoma en una muestra de un paciente. La biofirma que se basa en la presencia o la cantidad de uno o varios biomarcadores, se define más bien en términos generales y la fosforilación es solo una entre una gran cantidad de características de exosomas posiblemente relevantes.

20 Al-Nedawi et al., Cell Cycle 8:13 (2009), páginas 2014-2018 indican que las microvesículas se pueden recuperar desde la sangre de pacientes con cáncer y revelan la presencia de oncogenes en sus tumores, sirviendo de este modo como biomarcadores. Los cambios en la fosforilación de tales biomarcadores solo se mencionan brevemente, mientras que Al-Nedawi et al., Nature Cell Biology, vol. 10, nº 5 (2008), páginas 619-624, se refieren únicamente a EGFRVIII fosforilado en general, pero no a los sitios de fosforilación específicos o a su uso para controlar la progresión de un cáncer o la eficacia terapéutica de un tratamiento contra el cáncer.

25 Por lo tanto, sería altamente deseable proporcionar un método que permita una detección médicamente útil, rápida y sensible de oncogenes mutados, en conjunción con transductores moleculares, moduladores y efectores de su actividad, asociados con el cáncer y con un método para supervisar la progresión y/o el tratamiento del cáncer.

30 En esta memoria se describe un método para diagnosticar o determinar el pronóstico, o una predicción terapéutica de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de recoger una muestra del sujeto, aislar microvesículas de la muestra y detectar la presencia de una proteína oncogénica, una proteína relacionada con un tumor y/o una proteína asociada con MVs en las microvesículas, en donde la presencia de la proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en la muestra es indicativa de que el sujeto puede tener cáncer.

35 También se describe un método para detectar la presencia de una proteína oncogénica, una proteína relacionada con un tumor y/o una proteína asociada con MVs en un sujeto, que comprende recoger una muestra del sujeto, aislar microvesículas desde la muestra y detectar la presencia de la proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en las microvesículas.

40 Además, el método descrito en este documento puede comprender también la etapa de medir la fosforilación, u otro estado de modificación postraduccional de la proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor (por ejemplo, una proteína transductora de señales oncogénicas o mediadora del efecto oncogénico), y/o la proteína asociada con MVs.

También se describe un kit para detectar un cáncer en una muestra de un sujeto, que comprende al menos un anticuerpo contra una proteína oncogénica, una proteína relacionada con un tumor y/o una proteína asociada con MVs, e instrucciones para usar dicho al menos un anticuerpo para detectar la proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en microvesículas de la muestra.

45 Además, se describe también un uso de al menos un anticuerpo para diagnosticar o determinar el pronóstico de un cáncer en una muestra de un sujeto, en donde dicho al menos un anticuerpo se une a una proteína oncogénica, una proteína relacionada con un tumor y/o una proteína asociada con MVs presente en las microvesículas.

En particular, el al menos un anticuerpo es un anticuerpo fosfoespecífico.

50 También se describe en la presente memoria un uso de un agente que bloquea el intercambio de microvesículas para tratar el cáncer. En una realización particular, el agente es anexina V o un derivado de la misma o un agente que bloquea la P-selectina o su ligando PSGL, u otros agentes similares que bloquean receptores para moléculas que participan en la captación de MVs relacionadas con el cáncer a través de células diana.

Además se describe un método para supervisar la progresión de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de, en una primera muestra recogida a partir de un sujeto que tiene cáncer en un primer punto de tiempo, aislar las

microvesículas de la primera muestra y medir una proteína oncogénica, una proteína relacionada con un tumor y/o una proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra; y, en una segunda muestra recogida a partir del sujeto que tiene cáncer en un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo se produce después del primer punto de tiempo, aislar las microvesículas de la segunda muestra y medir la proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra, en donde un cambio en la cantidad de proteína oncogénica, proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra en comparación con la cantidad de proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, es indicativo de la progresión del cáncer.

También se incluye que el primer punto de tiempo se puede producir antes de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer y el segundo punto de tiempo se puede producir después de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer. En otra realización, los dos puntos de tiempo se pueden producir después de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer. En una realización, el tratamiento contra el cáncer es una resección quirúrgica o la extirpación del tumor.

Una reducción o una falta de cambio en la cantidad de proteína oncogénica, proteína relacionada con un tumor y/o proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra en comparación con la cantidad de proteína oncogénica, proteína relacionada con un tumor y/o proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, indica una eficacia terapéutica del tratamiento contra el cáncer.

También se describe un método para supervisar la eficacia terapéutica de un tratamiento contra el cáncer, que comprende las etapas de recoger una primera muestra a partir de un sujeto que tiene cáncer en un primer punto de tiempo, aislar microvesículas de la primera muestra y medir una proteína oncogénica, una proteína relacionada con un tumor y/o una proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra; y recoger una segunda muestra a partir del sujeto que tiene cáncer en un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo tiene lugar después del primer punto de tiempo, aislar las microvesículas de la segunda muestra y medir la proteína oncogénica, la proteína relacionada con un tumor y/o la proteína asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra; en donde una reducción o una falta de cambio en la cantidad de proteína oncogénica, relacionada con el tumor y/o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra en comparación con la cantidad de proteína oncogénica, relacionada con el tumor y/o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, indica una eficacia terapéutica del tratamiento contra el cáncer. En otras realizaciones, un cambio en la composición de las MVs es indicativo de una eficacia terapéutica.

El primer punto de tiempo se puede producir antes de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer y el segundo punto de tiempo se puede producir después de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer. Alternativamente, el primer y el segundo punto de tiempo se pueden producir ambos después de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer. En aún otra realización, el primer y el segundo punto de tiempo se pueden producir tanto en ausencia de tratamiento contra el cáncer como antes de que el sujeto reciba un tratamiento contra el cáncer, y la cantidad de proteína oncogénica, relacionada con el tumor y/o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra, en comparación con la de la primera muestra, proporcionaría una indicación de la progresión o la agresividad del cáncer.

Al menos dos proteínas oncogénicas, relacionadas con un tumor y/o asociadas con MVs se pueden detectar en las microvesículas. Más específicamente, las proteínas oncogénicas o asociadas con MVs pueden ser EGFR y HER-2, o HER-2 y HER-3, o HER-2 y EGFR2, o EGFRvIII y HER-2. En otra realización, las proteínas asociadas con MVs pueden ser EGFR, FGFR3, EphB2, ROR1, EphA2 y EphA4, solas o en combinación.

Las microvesículas se pueden aislar mediante ultracentrifugación, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, filtración en gel, purificación por afinidad, microfiltración o combinaciones de las mismas, u otros métodos similares, entre los cuales muchos son conocidos en la técnica.

Además, la presencia de la proteína oncogénica, relacionada con un tumor o asociada con MVs en las microvesículas, se puede detectar o medir mediante inmunotransferencia, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, citometría de flujo, microscopía electrónica, plataformas de matrices de anticuerpos, plataformas de multiplexación basadas en anticuerpos o espectrometría de masas.

Los métodos tal y como se describen en esta memoria, pueden comprender además la etapa de medir el estado de fosforilación de la proteína oncogénica, relacionada con un tumor o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera y la segunda muestra.

Compendio de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, la invención se refiere a un método para supervisar la progresión de un cáncer o la eficacia terapéutica de un tratamiento contra el cáncer en un

sujeto, que comprende:

a) aislar microvesículas a partir de una primera muestra de fluido corporal que se ha recogido desde un sujeto que tiene cáncer en un primer punto de tiempo y controlar el estado de uno o varios sitios de fosforilación distintos de una proteína oncogénica o relacionada con un tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra de fluido corporal; y

b) aislar las microvesículas a partir de una segunda muestra de fluido corporal que se ha recogido desde el sujeto que tiene cáncer en un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo se produce después del primer punto de tiempo y controlar el estado de uno o varios sitios de fosforilación distintos de la proteína oncogénica o la proteína relacionada con un tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra de fluido corporal;

en donde un cambio en el estado de dicho uno o varios sitios de fosforilación distintos de la proteína oncogénica o relacionada con un tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra de fluido corporal, en comparación con las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra de fluido corporal, indica progresión o regresión del cáncer o indica una eficacia terapéutica o ineficacia del tratamiento contra el cáncer, cuando el primer punto de tiempo se produce antes de que el sujeto haya recibido un tratamiento contra el cáncer y el segundo punto de tiempo se produce después de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer; y en donde la regresión del cáncer o la eficacia terapéutica del tratamiento contra el cáncer se indica por un aumento de la forma no activa de la proteína oncogénica o relacionada con un tumor, y la progresión del cáncer o la ineficacia del tratamiento contra el cáncer se indica por un aumento en la forma activada de la proteína oncogénica o relacionada con un tumor, tal y como se determina por el estado de dicho uno o varios sitios de fosforilación distintos, detectados en las microvesículas, en donde la proteína oncogénica o relacionada con un tumor es EGFR y el uno o varios sitios de fosforilación distintos se seleccionan a partir del grupo que consiste en T693, Y1110, Y1197, T678 e Y1068.

Una reducción o una falta de cambio en la fosforilación de la proteína oncogénica, relacionada con un tumor y/o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra, en comparación con la cantidad de fosforilación de la proteína oncogénica o relacionada con el tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, indica la eficacia terapéutica del tratamiento contra el cáncer.

Alternativamente, un aumento en la fosforilación de la proteína oncogénica o relacionada con un tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra, en comparación con la cantidad de fosforilación de la proteína oncogénica o relacionada con un tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, indica que el cáncer ha progresado o ha seguido proliferando.

Por otra parte, una reducción en la fosforilación de la proteína oncogénica o relacionada con el tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra, en comparación con la cantidad de fosforilación de la proteína oncogénica o relacionada con un tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, indica que el cáncer ha revertido o ha cesado la fase de crecimiento activo (estabilizado).

Además, una falta de cambio en la fosforilación de la proteína oncogénica, relacionada con un tumor y/o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra, en comparación con la cantidad de fosforilación de la proteína oncogénica, relacionada con el tumor y/o asociada con MVs en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra, indica que el cáncer no ha progresado.

También se describe en el presente documento una microvesícula aislada que comprende una proteína oncogénica, relacionada con un tumor o asociada con MVs.

El tratamiento contra el cáncer puede ser una cirugía, radiología, quimioterapia o un tratamiento dirigido contra el cáncer. Más específicamente, el tratamiento dirigido contra el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste en terapia con moléculas pequeñas, anticuerpos monoclonales, vacunas contra el cáncer, antisentido, ARNs, aptámeros, terapia génica y combinaciones de las mismas.

En otra realización, el cáncer incluido se selecciona a partir del grupo que consiste en cáncer de mama, glioma, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer hematológico, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, sarcoma uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal o colorrectal, cáncer anal, cáncer de colon, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma endometrial, cáncer cervical, cáncer de vulva, carcinoma de células escamosas, carcinoma vaginal, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, tumor del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, tumor del SNC, astrocitoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, linfoma del SNC primario, tumor de la médula ósea, gliomas del nervio tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, melanoma uveal, cáncer testicular, cáncer oral, cáncer faríngeo, neoplasias pediátricas, leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, glioma pediátrico, meduloblastoma, tumor de Wilms, osteosarcoma, teratoma, rhabdomioblastoma y sarcoma.

En una realización, más de una proteína oncogénica, relacionada con un tumor y/o asociada con MVs, o una combinación de proteínas oncogénicas, relacionadas con un tumor y/o asociadas con MVs, se pueden detectar en las microvesículas y/o se pueden utilizar en los métodos descritos. En una realización de la invención, el estado de fosforilación de la proteína oncogénica, relacionada con un tumor y/o asociada con MVs (es decir, EGFR) o las proteínas en las microvesículas, se determina y/o se utiliza en los métodos de la invención. En una realización, la proteína asociada con MVs está fijada a la membrana, por ejemplo, una proteína de la membrana integral o unida a la membrana. En una realización alternativa, la proteína asociada con MVs es una proteína soluble presente en el lumen de la microvesícula.

Además, la muestra es un fluido corporal, o más específicamente, un fluido corporal seleccionado a partir del grupo que consiste en sangre, orina, linfa, fluido cerebroespinal, ascitis, saliva, lavado, semen, secreciones glandulares, exudado, contenido de quistes y heces.

Se proporcionan además métodos para el control de la activación de un receptor oncogénico de tirosina cinasa en un tumor, que comprende recoger una muestra de sangre de un sujeto que tiene el tumor, aislar las microvesículas desde la muestra de sangre y medir el estado de fosforilación del receptor oncogénico de tirosina cinasa en las microvesículas, en donde el estado de fosforilación del receptor oncogénico de tirosina cinasa indica la activación o la no activación del receptor de tirosina cinasa.

En una realización particular, el tipo de cáncer es cáncer de mama, glioma, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de próstata y cáncer colorrectal.

Debe entenderse que los métodos y los kits descritos en este documento no se limitan a proteínas oncogénicas, pero incluyen las proteínas asociadas con MVs (por ejemplo, proteínas relacionadas con un tumor) identificadas en la presente memoria, además de otras proteínas relacionadas con el cáncer o proteínas conocidas relacionadas con un tumor maligno, tales como oncogenes, supresores tumorales o mediadores de la señalización celular y cualquier otra proteína detectada en las microvesículas que se puede encontrar que está relacionada con un tumor. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "proteína asociada con MVs" se refiere a cualquier proteína asociada con el cáncer que se detecta en una microvesícula obtenida a partir de un tumor y es útil para la detección, el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento, etc. del tumor, de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento. Ejemplos no limitantes de proteínas asociadas con MVs, incluyen proteínas oncogénicas, proteínas supresoras de tumores, mediadores de la señalización celular, receptores de tirosina cinasa, biomarcadores y proteínas enumeradas en las Tablas 1-4 en esta memoria.

También se debe entender que en algunos casos, puede ser la ausencia o la reducción de una proteína que normalmente está presente en el tejido normal, lo que es un diagnóstico o pronóstico de un cáncer. Por ejemplo, la ausencia o la reducción de los niveles de una proteína supresora de tumor en las MVs, también puede ser útil para la detección, el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento, etc., de un tumor.

La medición de otras modificaciones postraduccionales en las proteínas asociadas con MVs, tales como la escisión de isoformas, los patrones de glicosilación y así sucesivamente, también se puede utilizar para la detección, el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento, etc., de un tumor.

Por consiguiente, también los métodos para detectar un cáncer en un sujeto, en donde una muestra de un fluido corporal, por ejemplo, sangre, se recoge a partir del sujeto, las microvesículas se aíslan desde la muestra y las microvesículas se someten a ensayo para determinar la presencia de una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor en las microvesículas, en donde la presencia de una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor en las microvesículas, indica que el sujeto tiene cáncer. En algunas realizaciones, se describe además del método inventivo que la proteína oncogénica o relacionada con un tumor no se detecta en un espécimen de biopsia (por ejemplo, una muestra de tejido) obtenido a partir del sujeto.

Breve descripción de los dibujos

Habiendo descrito por tanto en general la naturaleza de la invención, se hará ahora referencia a los dibujos que se acompañan que muestran a modo de ilustración, una realización o realizaciones de la misma y en donde:

La Fig. 1 ilustra la producción de microvesículas que contienen EGFRvIII mediante células de glioma humanas en donde en (A) se muestra la generación de múltiples estructuras microvesiculares en las superficies de células de glioma U373vIII que albergan el oncogén EGFRvIII (puntas de flecha en blanco, imagen con SEM), pero no en sus homólogos parentales U373 benignos; en (B) se muestra el aumento de la abundancia de la fracción microvesicular de los medios condicionados, como una función de la expresión de EGFRvIII en un glioma U373 (medida por el contenido total de proteínas); en (C) se muestra la inclusión de EGFRs oncogénicos en microvesículas obtenidas a partir de balsas lipídicas liberadas por las células de cáncer que expresan EGFR; en (D) se muestra la dependencia de las propiedades oncogénicas de las células U373vIII sobre EGFRvIII funcional; en (E) se muestra la expresión predominante de EGFRvIII pero no de EGFR en tumores U373vIII; en (F) se muestra la liberación de microvesículas que contienen EGFRvIII y positivas para flotilina- - en la sangre circulante de ratones SCID portadores de tumores U373vIII (paneles superiores);

La Fig. 2 ilustra la transferencia microvesicular de EGFRvIII oncogénico entre células de glioma, en donde en (A) se muestra que las células U373 incubadas con microvesículas liberadas por sus homólogos transformados con EGFRvIII (U373vIII) adquirirían la expresión del antígeno EGFRvIII en su superficie (FACS); en (B) se muestra la detección de EGFRvIII en la superficie de las células U373 incubadas con microvesículas obtenidas a partir de U373vIII; en (C) se observa la generación de la línea celular U373/EGFRvIII-GFP mediante la expresión de EGFRvIII marcado con GFP en células U373; y en (D) se observa la fluorescencia directa de GFP de células U373 incubadas con microvesículas que contienen EGFRvIII-GFP;

La Fig. 3 ilustra la activación de las rutas de señalización que favorecen el crecimiento en células que han adquirido EGFRvIII oncogénico a través de una transferencia intercelular mediada por microvesículas, en donde en (A) se muestra el aumento dependiente de EGFRvIII de la fosforilación mediada por Erk1/2 en células U373 que han incorporado microvesículas desprendidas desde células U373vIII; en (B) se observa la inhibición de la fosforilación mediada por Erk1/2 en células U373 mediante el bloqueo de la captación de sus microvesículas que contienen EGFRvIII con anexina V; y en (C) se observa el aumento de la fosforilación de Akt en células U373 que han incorporado microvesículas que contienen EGFRvIII;

La Fig. 4 ilustra la inducción de una transformación celular mediante la captación de microvesículas que contienen EGFRvIII, en donde en (A) se muestra un aumento dependiente de EGFRvIII en la secreción de VEGF a través de células U373 que han incorporado microvesículas de U373vIII; en (B) se muestra que la estimulación de la actividad del promotor de VEGF en las células U373 mediante la incorporación de microvesículas que contienen EGFRvIII, se puede bloquear con un tratamiento previo con anexina V; en (C) se muestra el aumento de la expresión de BclXL (prosupervivencia) y la reducción de la expresión de p27 (inhibidor del ciclo celular) en células U373 expuestas a microvesículas que contienen EGFRvIII y en (D-E) se observa el aumento de la capacidad formadora de colonias en agar de las células U373 después de un tratamiento previo con microvesículas que contienen EGFRvIII;

La Fig. 5 ilustra un análisis de transferencia Western de microvesículas transportadas por la sangre en donde la detección de EGFRvIII circulante procedente de muestras de sangre de 6 pacientes (carriles 1 a 6) con glioblastoma multiforme se muestra para el paciente 2 (bandas circulares) y, potencialmente, para el paciente 3;

La Fig. 6 ilustra estructuras de tipo microvesículas *in vivo*, en donde en (A) se muestra una Micrografía Electrónica de Transmisión de estructuras microvesiculares presentes en el espacio intercelular entre dos células cancerosas (flecha negra) dentro del xenoinjerto del tumor mixto en el ratón SCID (barra - 1 metro); y en (B) la inmunotinción con oro de EGFRvIII revela la presencia de ese receptor (flecha blanca) en asociación con las estructuras de tipo microvesículas que se encuentran dentro de los tumores U373vIII/U373-GFP mixtos (barra - 100 nm); y

La Fig. 7 ilustra la emisión del material positivo para FLAG/EGFRvIII procedente de células U373vIII en tumores mixtos *in vivo*, en donde se muestra una representación fotográfica de una microscopía confocal de tumores mixtos compuestos por U373-GFP (verde) y células de glioma U373vIII-FLAG (rojo) y con tinción de GFP (verde, panel A) y FLAG (rojo, panel B), respectivamente; los canales fusionados (C y D) revelan la presencia de las estructuras de tipo microvesículas positivas para FLAG/EGFRvIII (flechas) que están asociadas no solo con células claramente positivas para FLAG/EGFRvIII (U373vIII-FLAG, lado derecho de los paneles C y D), sino también con células positivas para GFP (U373-GFP) (barras - 5 pm).

La Fig. 8 ilustra la detección del oncogén EGFRvIII asociado con microvesículas (MVs) en una cohorte de pacientes con glioblastoma multiforme (GBM), en donde (+) indica la detección de la oncoproteína en las microvesículas (MVs) en una muestra de sangre o la detección del oncogén en una muestra de tumor usando PCR y (-) indica que no se detectó la oncoproteína/oncogén, en una cohorte (coh.) de 24 pacientes procedentes del Toronto Tumor Bank (TO);

La Fig. 9 ilustra la detección de la señal de EGFR (EGFR de tipo silvestre (wt EGFR) o EGFRvIII mutante) en MVs recogidas de la sangre de ratones SCID portadores de xenotransplantes de líneas celulares de cáncer humano, en donde las células A431 obtenidas a partir de SCC expresan EGFR de tipo silvestre, U373vIII obtenidas a partir de glioma expresan principalmente el EGFRvIII mutante y Cc son muestras de plasma de ratón de control y en donde la señal de EGFR se detecta usando ELISA para EGFR;

La Fig. 10 ilustra la detección de múltiples dianas moleculares relacionadas con el cáncer en la carga de microvesículas liberadas por células tumorales humanas en el medio de cultivo, en donde en (A), las líneas celulares indicadas se sometieron a ensayo para estudiar las proteínas indicadas utilizando un análisis Western, en donde (+) indica una fuerte reactividad, (+/-) indica una reactividad débil y (-) indica que no hay una reactividad detectable; y en (B), se muestran ejemplos del análisis de una transferencia de Western, en donde las proteínas detectadas se muestran a la derecha y las líneas celulares se muestran arriba;

La Fig. 11 ilustra la detección *in vitro* de múltiples fosfo-receptores de tirosina cinasa (RTKs) en MVs liberadas en el medio de cultivo por varios tipos de células de cáncer humano, utilizando una matriz de anticuerpos de fosfoproteína que contiene sondas para 42 fosfo-RTKs, en donde en (A), se enumeran ejemplos de RTKs para los que se puede detectar simultáneamente una fosforilación relativa en una única muestra usando la matriz; en (B), se muestran fosfo-RTKs importante detectados en MVs de las líneas celulares indicadas; y en (C), se muestran ejemplos de los resultados del ensayo, en donde las líneas de células se indican a la derecha;

La Fig. 12 ilustra un ejemplo de un ensayo con RTKs en el que se examina el perfil fosfoproteico de MVs que circulan en la sangre de ratones que albergaban un xenoinjerto de tumor humano A431, en donde: EGFR/HER-1 es el receptor del factor de crecimiento epidérmico; ErbB2/HER-2 es el receptor del factor de crecimiento epidérmico 2; ErbB3/HER-3 es el receptor del factor de crecimiento epidérmico 3; ErbB4/HER-4 es el receptor del factor de crecimiento epidérmico 4; FGFR1 es el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1; FGFR2a es el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos a; InsulinR es el receptor de insulina; IGF-1 R es el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1; Axl es receptor de Gas6; Dtk/TYR03 es el receptor de Gas6 que interacciona con PI3K; Mer/MERTK es la proteína de la retinitis pigmentosa; HGFR/MET es el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos; y MSPR/MST1 R/RON es el receptor de la proteína estimulante de macrófagos; PDGFRa es el receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas; PDGFRb es el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas; SCFR/cKit/CD1 7 es el receptor del factor de células madre; Flt-3/CD135 es el receptor 3 de tirosina cinasa similar a fms; M-CSFR/CSF1 R/CD-15 es el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos; c-Ret es el receptor para la familia de ligandos v; ROR1 es el receptor huérfano 1 relacionado con RAR (nuclear, se une a melatonina); ROR2 es el receptor huérfano 1 relacionado con RAR (nuclear); Tie-1 es el receptor huérfano implicado en la angiogénesis; Tie-2 es el receptor de la angiopoyetina; TrkA/NTRK1 es el receptor A del factor de crecimiento nervioso (NGF); TrkB/NTRK2 es el receptor del factor neurotrófico obtenido a partir del cerebro (BDNF); TrkC/NTRK3 es el receptor de neurotrofina 3 (NT-3); VEGFR1/FIM es el receptor de VEGF/PIGF; VEGFR2/KDR/Flk-1 es el receptor de la señalización de VEGF; VEGFR3/Flt-4 es el receptor de VEGF-C/D (linfangiogénesis); MuSK es el receptor de cinasa específica de músculo/agnina (señalización neuromuscular); EphA1 es el receptor de efrina de tipo A; EphA2 es el receptor 2 de efrina de tipo A; EphA3 es el receptor 3 de efrina de tipo A; EphA4/TYRO1/SEK es el receptor 4 de efrina de tipo A; EphA6 es el receptor 6 de efrina de tipo A; EphA7 es el receptor 7 de efrina de tipo A; EphB1 es el receptor 1 de efrina de tipo B; EphB2/DRT/Tyro5 es el receptor 2 de efrina de tipo B; EphB4/MYK1/TYRO11 es el receptor 4 de efrina de tipo B; y EphB6 es el receptor 6 de efrina de tipo B; y

La Fig. 13 ilustra una reducción del EGFR humano fosforilado en MVs que circulan en la sangre de ratones que son portadores de tumores subcutáneos dirigidos por EGFR y tratados con el inhibidor de EGFR, CI-1022, en donde en (A), se muestra la capacidad de respuesta de los tumores A431 y U373vIII frente a una exposición a una dosificación diaria de CI-1033; el volumen del tumor (mm³) se muestra en el eje y, y los días después de la inoculación se muestran en el eje x; y en (B), se muestra una transferencia Western de MVs procedentes de ratones portadores de tumores A431 subcutáneos, tratados durante 7 días con 20 mg/kg de CI-1033 por vía intraperitoneal (parte superior) y de ratones portadores de tumores U373vIII tratados durante 7 días con 20 mg/kg de CI-1033 por vía intraperitoneal (parte inferior), en donde el anticuerpo anti-fosfo-EGFR se utilizó para el análisis Western.

Descripción detallada de la realización preferida

Un método para el seguimiento de la progresión de un cáncer y/o la respuesta a un tratamiento, se proporciona de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

El cáncer se refiere en esta memoria a un agrupamiento de células de cáncer que muestran una proliferación excesiva por la falta de coordinación del crecimiento y una proliferación de las células debida a la pérdida de la capacidad de diferenciación de las células.

El término "cáncer" incluye pero no se limita a cáncer de mama, glioma, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer hematológico, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, sarcoma uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal o colorrectal, cáncer anal, cáncer de colon (considerado generalmente la misma entidad que cáncer colorrectal y de intestino grueso), tumores del estroma gastrointestinal (GIST), carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma endometrial, cáncer cervical, cáncer de vulva, carcinoma de células escamosas, carcinoma vaginal, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, tumor del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, tumor del SNC, astrocitoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, linfoma del SNC primario, tumor de la médula ósea, gliomas del nervio tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, melanoma uveal (también conocido como melanoma intraocular), cáncer testicular, cáncer oral, cáncer faríngeo, neoplasias pediátricas, leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, glioma pediátrico, meduloblastoma, tumor de Wilms, osteosarcoma, teratoma, rabdomioblastoma y sarcoma, o una combinación de los mismos. En una realización, el cáncer es un tumor cerebral, por ejemplo, un glioma. En otra realización, el cáncer expresa ciertas oncoproteínas, por ejemplo, HER-2, HER-3, etc. El término "cáncer" incluye también cánceres pediátricos, incluyendo neoplasias pediátricas, que incluyen leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, glioma, rabdomioblastoma, sarcoma y otros tumores malignos.

Ejemplos no limitantes de proteínas oncogénicas que se pueden detectar utilizando los métodos descritos en este documento, son los siguientes: (i) oncoproteínas asociadas a la membrana obtenidas a partir de células cancerosas, tales como EGFRvIII en glioma, EGFR en carcinoma de células escamosas, glioma, cáncer de pulmón o cáncer de vejiga, mutante de cáncer de mama (por ejemplo, las proteínas BRCA1 y/o BRCA2 supresoras tumorales mutantes o no expresadas, sensibles a Iressa), EGFR en cáncer de pulmón, HER-2 en carcinoma de mama y de ovario, MET en diversos cánceres metastásicos e invasivos, Kit en tumores del estroma gastrointestinal, PDGFR en glioma, Wnt

en diversos tumores, diversas fosfatasa; (ii) agrupaciones combinatorias de receptores transformantes, tales como EGFR/HER-2 en el cáncer de mama, HER-2/HER-3 en varios tumores; (iii) moléculas citoplasmáticas asociadas a la membrana con propiedades transformantes, tales como K-ras en el cáncer colorrectal, de páncreas y de pulmón, PTEN (falta de o inactivación) en glioma y cáncer de próstata; (iv) complejos de señalización que podrían estar presentes (y activos) en las balsas lipídicas y las microvesículas tales como PI3K/Akt, Raf/MEK/MAPK; y (v) receptor endotelial relacionado con un tumor, relacionado con la angiogénesis tumoral y la antiangiogénesis, tal como VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-2 y TEMs (por ejemplo, TEM-1, CD276). Estas proteínas se pueden detectar de forma aislada o en combinación.

Otros ejemplos no limitantes de proteínas oncogénicas incluyen EGFRvIII, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, MET, cKit, PDGFR, Wnt, beta-catenina, K-ras, H-ras, N-ras, Raf, N-myc, c-myc, IGFR, PI3K y Akt; proteínas supresoras de tumores, tales como BRCA1, BRCA2 y PTEN; receptores de hospedadores relacionados con el cáncer y moléculas asociadas con microvesículas, por ejemplo, los implicados en la angiogénesis, tales como VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-2, TEM-1 y CD276. Se contempla que todas las proteínas oncogénicas, proteínas supresoras tumorales, receptores relacionados con células hospedadoras y moléculas asociadas con microvesículas se pueden utilizar, de forma aislada o en combinación, en los métodos, composiciones y kits de la presente invención. Se contempla, además, que cualquier proteína oncogénica y cualquier combinación de proteínas oncogénicas, que se determina que es importante de forma mecánica, para el diagnóstico, pronóstico o terapéuticamente para el cáncer, se pueden utilizar en los métodos y composiciones descritos.

Es bien conocido en la técnica que las "proteínas oncogénicas" son proteínas que son productos de genes mutantes y que causan o contribuyen a la transformación de células normales en células tumorales cancerosas o desde cáncer de grado bajo hasta cáncer de grado alto (para una revisión, véase Vogelstein y Kinzler, Nat. Medicine, 10(8): 789-799, 2004; Croce, CM., N. Engl. J. Med. 358(5): 502-511, 2008).

Existen tres tipos principales de genes responsables de la tumorigénesis: los oncogenes, los genes supresores tumorales y los genes de estabilidad. Los oncogenes generalmente han mutado de tal manera que la proteína codificada por el gen (la proteína oncogénica) se vuelve constitutivamente activa, sobreexpresada, mal expresada (por ejemplo, en el momento o lugar equivocado) o activa en condiciones en las que la proteína de tipo silvestre no lo está.

En contraste, los genes supresores tumorales mutan generalmente para reducir su actividad génica, lo que da lugar a una proliferación celular incontrolada y tumorigénesis. Los genes de estabilidad también se inactivan generalmente por mutación. Estos genes se denominan "genes de estabilidad", porque en su forma de tipo silvestre sirven para minimizar las mutaciones genéticas. Están involucrados, por ejemplo, en la reparación del ADN, la recombinación mitótica y la segregación cromosómica. La inactivación de estos genes conduce a una mayor tasa de mutación general, lo que aumenta la probabilidad de que se produzca una mutación tumorigénica en un oncogén o un gen supresor tumoral. Está claro, pues, que, además de las proteínas oncogénicas, los cambios en los genes supresores tumorales y de estabilidad también están asociados y pueden ser indicativos del cáncer.

También se sabe que los supresores tumorales pueden servir para inducir la apoptosis en células que albergan mutaciones.

También está bien establecido que las mutaciones de genes cancerígenos actúan frecuentemente en las rutas o redes. Por ejemplo, las proteínas oncogénicas pueden actuar para regular las proteínas efectoras aguas abajo, que pueden a su vez regular otras proteínas, lo que conduce a una cascada de acontecimientos de señalización que finalmente dan lugar a una transformación cancerosa. Por lo tanto, se debe entender que además de los cambios en las propias proteínas oncogénicas, los cambios en tales proteínas efectoras o mediadoras aguas abajo también se asocian y pueden ser indicativos del cáncer.

Se debe entender por lo tanto que, además de las proteínas oncogénicas que provocan una transformación celular, los cambios en otras proteínas también están asociados con la tumorigénesis y se pueden detectar en microvesículas obtenidas a partir de tumores. Tales otras proteínas se denominan en esta memoria "proteínas relacionadas con tumores". Ejemplos no limitantes de proteínas relacionadas con tumores incluyen: proteínas supresoras de tumor; proteínas de estabilidad; y proteínas aguas abajo de proteínas oncogénicas (es decir, proteínas efectoras aguas abajo) tales como los receptores celulares relacionados con tumores, mediadores de la señalización celular, factores de transcripción, receptores nucleares, biomarcadores asociados con el cáncer y la tumorigénesis y proteínas asociadas con la angiogénesis tumoral, la migración o la invasión. Por ejemplo, la expresión "proteínas relacionadas con tumores" incluye receptores endoteliales relacionados con tumores, relacionados con la angiogénesis tumoral y la antiangiogénesis, tales como VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-2 y TEMs (por ejemplo, TEM-1, CD276). Los cambios en la expresión o la actividad de "proteínas relacionadas con tumores" que están asociadas con la tumorigénesis, se pueden determinar en las microvesículas obtenidas a partir de tumores (por ejemplo, se ha observado una regulación a la baja de una proteína supresora tumoral en una microvesícula obtenida a partir de tumor, o un aumento de la expresión o una activación de un receptor endotelial relacionado con tumores, tal como VEGFR-2 o VEGFR-1). Se contempla que, además de las proteínas oncogénicas, cualquier proteína relacionada con un tumor, que se determina que es importante de forma mecánica, para el diagnóstico, pronóstico o terapéuticamente del cáncer, se puede usar en los métodos, composiciones y kits como se describe en

esta memoria.

La expresión "proteína asociada con MVs" tal y como se utiliza en esta memoria, incluye tanto proteínas oncogénicas como proteínas relacionadas con tumores, como se han definido anteriormente, que se detectan en microvesículas obtenidas a partir de tumores y son útiles para la detección, el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento, etc., del tumor, de acuerdo con los métodos proporcionados en este documento.

La invención descrita en el presente documento se basa, al menos en parte, en la observación novedosa e inesperada de que la oncoproteína EGFRvIII puede ser emitida y compartida entre las células de glioma a través de una transferencia intercelular del receptor activado que se produce como una carga de microvesículas obtenidas a partir de membranas, liberadas desde las células que producen la proteína mutante. De hecho, EGFRvIII estimula la formación de microvesículas relacionadas con balsas lipídicas, a las que se incorpora.

Las microvesículas que contienen la oncoproteína EGFRvIII se liberan a un medio condicionado o a la sangre de ratones portadores de tumores y se pueden fusionar con las membranas plasmáticas de las células tumorales que carecen de este receptor. Esta transferencia de EGFRvIII desencadena la activación de las rutas de señalización aguas abajo (MAPK y Akt), cambios relacionados con la progresión en la expresión génica (VEGF, BclXL, p27) y la manifestación de una transformación celular exacerbada, en particular una morfología alterada y un aumento de la eficiencia de la formación de colonias sobre agar blando. Estas observaciones señalan el papel de las microvesículas de la membrana en la propagación horizontal de proteínas transformantes entre diferentes subconjuntos de células cancerosas y sugieren que el impacto transformador de las oncoproteínas asociadas a la membrana se puede extender más allá de las células que albergan los genes mutantes correspondientes.

Se sabe que las células activadas de diversos tipos producen y desprenden en su entorno microvesículas de membrana, también conocidas como micropartículas, ectosomas o argosomas; en el caso en que tales vesículas se originan a partir de la ruta lisosómica, se denominan frecuentemente exosomas. El papel biológico de estas estructuras es poco conocido, pero puede incluir procesos de secreción, inmunomodulación, coagulación y comunicación intercelular (Janowska-Wieczorek et al., 2005, *Int. J. Cancer*, 20: 752-760).

Las microvesículas pueden variar en su mecanismo de generación, el tamaño y la composición, pero frecuentemente (especialmente los ectosomas) contienen un material asociado con las balsas lipídicas de la membrana, incluyendo proteínas transmembranales funcionales. Por ejemplo, el factor tisular procoagulante (TF) se puede liberar de esta manera desde células inflamatorias y, de manera importante, se incorpora posteriormente en las membranas de plaquetas, células endoteliales y otras células en donde ejerce sus efectos biológicos. Tal y como se emplea en esta memoria, el término "microvesículas" incluye microvesículas, micropartículas, ectosomas, argosomas, exosomas, vesículas tumorales y todos los demás cuerpos vesiculares liberados desde las células.

Las células cancerosas que carecen del gen supresor tumoral p53, pueden imitar en algunos casos este proceso mediante la liberación de cantidades alteradas de microvesículas que contienen TF (Yu et al., 2005, *Blood*, 105: 1734-1741), o microvesículas secretoras (Yu et al., 2006, *Cancer Res*, 66: 4795-47801) a la sangre y al medio pericelular.

Los receptores oncogénicos residen frecuentemente dentro de las regiones de la membrana plasmática, a partir de las cuales se originan las microvesículas en las células cancerosas (por ejemplo, balsas lipídicas). Se da a conocer en el presente documento que los receptores oncogénicos se pueden incluir ellos mismos en la carga de las microvesículas. Esto es de particular interés, por ejemplo, en tumores cerebrales malignos (gliomas), en donde la activación de EGFR asociado a la membrana representa un importante evento de transformación y en casi el 30% de los casos con glioblastoma multiforme (GBM), se puede detectar fácilmente la expresión del mutante oncogénico EGFRvIII.

Con el fin de explorar este fenómeno de forma adicional, se examinó la producción de microvesículas mediante células de glioma U373 en cultivo que carecían de EGFR activado y sus homólogos, modificados genéticamente para expresar EGFRvIII (células U373vIII). Curiosamente, la presencia del oncogén EGFRvIII en la última línea celular, daba como resultado la formación de múltiples salientes vesiculares en la superficie celular, un efecto que estaba acompañado por un aumento en la recuperación de proteína a partir de la fracción microvesicular del medio de cultivo (véase la Fig. 1A, B). Este material contenía una cantidad proporcional de flotilina-1, una proteína asociada con las balsas lipídicas de la membrana y que se encuentra frecuentemente en microvesículas relacionadas con balsas procedentes de varias fuentes. En conjunto, se demuestra que una transformación relacionada con EGFRvIII observada en las células U373vIII, está acoplada con una producción incrementada de microvesículas obtenidas a partir de balsas lipídicas de la membrana.

Las proteínas enriquecidas en microvesículas, tales como EGFRvIII, HER-2 y MET, se pueden detectar mediante varios métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los lisados de microvesículas se pueden analizar por inmunotransferencia utilizando anticuerpos tales como anti-EGFRvIII o anti-EGFR. Es necesario concentrar las microvesículas mediante centrifugación, pero también proporciona una considerable ventaja cuantitativa y cualitativa sobre el análisis de todo el plasma. Esto es debido a que el aislamiento de las microvesículas puede mejorar la sensibilidad de la detección de ciertas moléculas, por ejemplo, EGFRvIII (debido a su enriquecimiento en las

microvesículas), aumentar la especificidad (ya que las microvesículas no son colecciones aleatorias de moléculas de la membrana plasmática), proteger la carga de la proteólisis, desfosforilación o degradación (debida a la membrana de las microvesículas) y ampliar el alcance del análisis (debido a la presencia de combinaciones únicas y diagnósticamente informativas de proteínas en la carga de las microvesículas). En este sentido, la sensibilidad del análisis de las microvesículas se puede incrementar mediante un cambio de ultracentrifugación a microfiltración, en donde esta última puede simplificar y mejorar la recuperación de microvesículas. Otra técnica para detectar proteínas microvesiculares es la inmunoprecipitación de material relacionado con las microvesículas procedente de perlas magnéticas recubiertas, por ejemplo, con anexina V (ya que las MVs expresan grandes cantidades de fosfatidilserina) o un anticuerpo que se une a una proteína oncogénica que se expresa en la superficie de las MVs, tal como un anticuerpo anti-EGFRvIII. Además, también se puede utilizar un ensayo ELISA basado en dos anticuerpos (por ejemplo, 2 x anti-EGFRvIII o anti-EGFRvIII + anti-EGFR) o un radioinmunoensayo (RIA) basado en dos anticuerpos (por ejemplo, 2 x anti-EGFRvIII o anti-EGFRvIII + anti-EGFR). Además, el ELISA basado en la unión de las microvesículas a superficies recubiertas con anexina V (como, por ejemplo, en los ensayos de TF comerciales) o con anticuerpos de EGFRvIII/EGFR, se podría utilizar junto con un componente de detección basado en el anticuerpo anti-EGFRvIII. Otras técnicas que se pueden usar incluyen la citometría de flujo, en donde las microvesículas son capturadas por perlas recubiertas, por ejemplo, con anexina V, o anticuerpos específicos de moléculas (proteínas, hidratos de carbono y otras) presentes en sus superficies, o con reactivos de afinidad que no son anticuerpos (receptores, aptámeros, lectinas, secuencias de ácido nucleico y así sucesivamente) y se tiñen, por ejemplo, con anticuerpo anti-EGFRvIII y espectrometría de masas, en donde se detecta EGFR en el proteoma de preparaciones de microvesículas. Todos estos reactivos y métodos de captura también se podrían utilizar para aislar microvesículas utilizando columnas de purificación por afinidad y plataformas múltiples. Se contempla que las técnicas convencionales conocidas en la técnica para la preparación de microvesículas y para la detección de las proteínas, se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento.

La presente invención se basa, al menos en parte, en la observación de que se detecta una expresión abundante de la proteína EGFRvIII en los lisados no solo de las propias células U373vIII, sino también en sus microvesículas derivadas, demostrando que la oncoproteína intacta se libera de esta manera en la circulación. Aunque las células U373 parentales liberaban cantidades detectables de microvesículas que contenían flotilina-1, solo contenían pequeñas cantidades de EGFR de tipo silvestre (wtEGFR) y no EGFRvIII. Estos resultados se validaron frente a células endoteliales negativas para EGFR (HUVEC) y células A431 que expresaban solo wtEGFR, así como sus preparaciones de microvesículas respectivas (Fig. 1C). Aunque las células U373 muestran un fenotipo benigno *in vivo*, sus homólogas U373vIII forman con facilidad tumores subcutáneos en ratones inmunodeficientes (SCID), de una manera susceptible a inhibición con dosis diarias de un inhibidor irreversible de pan-Erb de molécula pequeña, CI-1033 (Fig. 1D). Los tumores U373vIII se teñían fuertemente en relación con EGFRvIII pero no con wtEGFR y, curiosamente, emitían microvesículas que contenían EGFRvIII en la circulación sistémica (Fig. 1E, F). Por lo tanto, la expresión del gen EGFRvIII mutante conduce al aumento de la agresividad de las células de glioma, junto con una liberación extracelular de microvesículas que contienen una oncoproteína EGFRvIII intacta.

La expresión heterogénea de EGFRvIII en glioma humano sugiere que diferentes subgrupos de células tumorales podrían desprender microvesículas que contienen EGFRvIII en el espacio intercelular común. Ya que las microvesículas se pueden fundir fácilmente con las membranas celulares a través de un mecanismo dependiente de fosfatidilserina, se demostró en esta memoria que EGFRvIII oncogénicos se pueden transferir de esta manera desde células de glioma más agresivas a benignas. Las células U373 negativas para EGFRvIII se incubaron, por lo tanto, con preparaciones de microvesículas obtenidas a partir de cualquiera de sus homólogos U373vIII que albergaban EGFRvIII, o a partir de células U373vIII-GFP modificadas genéticamente para expresar un oncogén EGFRvIII marcado con una proteína fluorescente verde (GFP), (EGFRvIII-GFP). Curiosamente, esto dio lugar a una captación mayor del contenido microvesicular por las células U373, como se demostró por la expresión de novo v del antígeno EGFRvIII y la fluorescencia de GFP (Fig. 2A-D).

La aparente transferencia intercelular mediada por microvesículas del receptor EGFRvIII ostensiblemente intacto, plantea la cuestión en cuanto a las consecuencias de la señalización (si las hay) de este evento para las células (U373) receptoras. Para abordar esta cuestión, se examinaron células U373 24 horas después de su exposición a microvesículas que contenían EGFRvIII para estudiar la activación de las cascadas de MAPK y Akt, ambas conocidas por mediar en los efectos transformantes aguas abajo de este oncogén. De hecho, la incorporación de EGFRvIII en la membrana plasmática de U373 daba lugar a un incremento constante de la fosforilación de Erk1/2. Este evento era dependiente de la transferencia de EGFRvIII activo, ya que las microvesículas obtenidas a partir de U373 que no contenían EGFRvIII, eran ineficaces. Además, el bloqueo irreversible de este receptor mediante una preincubación de las microvesículas obtenidas a partir de U373vIII con el inhibidor de pan-ErbB (CI-1033), reducía marcadamente la fosforilación de Erk1/2 (Fig. 3A). La fosforilación de Erk1/2 también fue suprimida mediante la preincubación de estas microvesículas con anexina V, que bloquea sus residuos de fosfatidilserina expuestos y de este modo su captación por las células U373. Estos resultados demuestran que no solo se requería el mero contacto entre las microvesículas que contenían EGFRvIII con la superficie de las células U373, sino más bien su integración real (dependiente de fosfatidilserina) y la transferencia de EGFRvIII para desencadenar la activación de la ruta MAPK en las células receptoras (Fig. 3B). La incorporación de microvesículas obtenidas a partir de U373vIII también inducía la fosforilación de Akt en células U373, de una manera que se podía inhibir con anexina V (Fig. 3C), y desencadenaba otros eventos diferentes, en particular la fosforilación de PDK1 y Raf.

Los efectos transformantes de las rutas dependientes de EGFRvIII en última instancia están mediados por la desregulación de varios genes responsables del crecimiento del tumor, la supervivencia y la angiogénesis. Con respecto a esto último, se observó que las células U373 expuestas a microvesículas obtenidas a partir de U373vIII, mostraban un marcado aumento (2-3 veces) de la producción de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un potente mediador de la angiogénesis del tumor cerebral y una diana conocida de EGFR. La actividad de EGFRvIII era esencial para este efecto, ya que las microvesículas obtenidas a partir de U373 (desprovistas de EGFRvIII), o las de U373vIII, pero preincubadas con CI-1033, eran incapaces de inducir esta liberación de VEGF (Fig. 4A). Con estos ajustes, las microvesículas que contenían EGFRvIII también estimulaban fuertemente la actividad del promotor de VEGF y este efecto era inhibido mediante su tratamiento previo con anexina V (Fig. 4B). En conjunto, estas observaciones demuestran que la incorporación de microvesículas de U373vIII desencadena un incremento dependiente de EGFRvIII en la expresión del gen VEGF y una producción de proteínas en las células U373, mediante la activación de las rutas de MAPK y Akt.

Aunque la regulación al alza de VEGF anuncia frecuentemente una activación de las rutas oncogénicas, la transformación celular aguas abajo de EGFRvIII está mediada por cambios en la expresión de genes implicados directamente en la proliferación celular y la supervivencia. En este sentido, las células U373 tratadas con microvesículas que contenían EGFRvIII revelaron un aumento en la expresión de la proteína antiapoptótica BclXL y una disminución de los niveles del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina p27/Kip1, ambas dianas conocidas de EGFR (Fig. 4C, D). Una vez más, esos efectos fueron inhibidos por un bloqueo mediado por anexina V de la captación de microvesículas a través de las células U373 receptoras. Cambios similares dependientes de EGFRvIII en la expresión de otros genes diana de EGFRvIII, por ejemplo p21/Cip, también se observaron.

Las consecuencias funcionales del repertorio mencionado anteriormente de respuestas moleculares provocadas por la incorporación de microvesículas que contienen EGFRvIII, pueden conducir a un mayor grado de transformación celular, como se demuestra por una mayor morfología del huso de las células U373 expuestas a este material (Fig. 2B). Las células U373 se preincubaron con microvesículas que contenían EGFRvIII y se sometieron a ensayo para estudiar el crecimiento en medios semisólidos, un ensayo de transformación paradigmático. Sorprendentemente, la incorporación de la oncoproteína de esta manera causaba un aumento de dos veces en la formación de colonias sobre agar blando, independientemente del anclaje, de las células U373, mientras que una exposición a cantidades equivalentes de microvesículas desprovistas de contenido en EGFRvIII, era intrascendente (Fig. 4D, E).

Es bien sabido que en los GBMs humanos, solo una pequeña subpoblación de células tumorales es portadora de la mutación genética primaria que conduce a la expresión de EGFRvIII, aunque hay un aumento de crecimiento de todo el tumor. En este sentido, se describe en el presente documento que la expresión de EGFRvIII provoca la formación de microvesículas celulares, a las que se incorpora esta proteína transmembranal y se desprenden en el micromedio pericelular (Figs. 6 y 7) y en la sangre (Fig. 1F). Los experimentos descritos en este documento demuestran que las microvesículas que contienen un oncogén activo de este tipo (oncosomas) pueden servir como vehículos para una transferencia rápida intercelular de la actividad transformante entre las células que comprenden los tumores cerebrales. Esto podría conducir a una propagación horizontal de una mayor capacidad proliferativa, de supervivencia y angiogénica incluso sin un enriquecimiento (anterior) en las células que albergan la mutación respectiva. Esta forma hasta ahora no apreciada de interacción intercelular es fundamentalmente diferente de la transferencia previamente postulada de fragmentos de ADN que contienen secuencias oncogénicas desde las células cancerosas apoptóticas a sus homólogos no transformados (fagocíticos). Un intercambio de microvesículas es también diferente por los efectos paracrinos inducidos por la secreción de ligandos solubles estimulantes tumorales, pero podría amplificar/modular los últimos efectos, compartiendo de forma intercelular receptores activos asociados a la membrana (y por lo tanto insolubles).

Confirmando que en los GBMs humanos, solo una pequeña subpoblación de células tumorales es portadora de la mutación genética primaria que conduce a la expresión de EGFRvIII, se detectaron las bandas tanto de EGFR de tipo silvestre como de EGFRvIII con los tamaños esperados y se determinaron usando un protocolo de SDS-PAGE estándar en microvesículas recogidas a partir de plasma humano de pacientes con GBM (Fig. 5).

Se incluye que una transferencia microvesicular similar también puede implicar otras tirosinas cinasas oncogénicas asociadas a la membrana, transformantes, mutantes, reguladas al alza o activadas de otro modo (por ejemplo, HER-2, wtEGFR, cKit o MET) y proteínas operativas en una variedad de tumores humanos. Las células hospedadoras (por ejemplo, del endotelio) también pueden ser dianas de microvesículas que contienen oncogenes. En un aspecto, las funciones que favorecen el tumor (por ejemplo angiogénesis) de una célula hospedadora se podrían intensificar mediante una transferencia microvesicular. Al contrario, las células hospedadoras asociadas a tumores se alteran frecuentemente de forma profunda o incluso contienen alteraciones citogenéticas manifiestas (Akino et al. Am. J. Pathol. 2009) y sus microvesículas derivadas (por ejemplo, que contienen marcadores endoteliales tumorales (TEMs) de células endoteliales) podrían poseer un valor diagnóstico, pronóstico y predictivo.

También se considera en este documento que agentes capaces de bloquear el intercambio de microvesículas entre células (por ejemplo, derivados de anexina V) pueden ser útiles como agentes terapéuticos, por ejemplo, para inhibir la propagación y el crecimiento del cáncer mediante una inhibición de la fusión de microvesículas con las células. Los métodos para el tratamiento del cáncer se dan a conocer y comprenden la administración de un agente de bloqueo del intercambio de microvesículas, por ejemplo, anexina V y/o derivados de la misma, a un sujeto que lo

requiere. Se contempla que cualquier agente que se podría utilizar para el bloqueo de la transferencia de microvesículas, micropartículas, ectosomas o exosomas se puede utilizar en tales métodos. Otros ejemplos no limitativos de tales agentes incluyen agentes bloqueantes de P-selectina o su ligando, PSGL.

5 Además se describen métodos para el diagnóstico del cáncer, que permiten la detección de múltiples proteínas oncogénicas y/o múltiples sitios de fosforilación dentro de las mismas, mediante la realización del análisis en las microvesículas. Por ejemplo, un cáncer se podría caracterizar mediante la determinación de si es portador de EGFRvIII, HER-2, wtEGFR, cKit o MET, solos o en combinación, mediante el análisis de la composición proteica de las microvesículas. El número de microvesículas que contienen proteínas oncogénicas que se encuentran en un fluido corporal también se puede usar como una forma de determinar la agresividad de un tumor, es decir, su
10 tendencia a extenderse o a la metástasis. Los métodos por lo tanto pueden ayudar en el diagnóstico y/o el pronóstico. El diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer de mama se puede determinar mediante la detección de la presencia de EGFR y/o HER-2. En una alternativa, el diagnóstico y/o el pronóstico de los tumores se determina detectando la presencia de HER-2 y/o HER-3. En otro método, el diagnóstico y/o el pronóstico del cáncer colorrectal se determina mediante la detección de la ausencia de una proteína relacionada con el tumor, tal como el supresor tumoral PTEN y/o p53 y la presencia de una proteína oncogénica tal como K-ras y/o c-Met, que es indicativa de un
15 tumor agresivo.

Además se describen métodos para supervisar la progresión de un cáncer y/o para supervisar la eficacia de un tratamiento o un régimen terapéutico. Por ejemplo, el tamaño y la naturaleza de un tumor se pueden controlar mediante el seguimiento de la cantidad y la composición de una proteína o proteínas oncogénicas, por ejemplo, EGFRvIII, HER-2, HER-3, cKit o MET, liberadas en las microvesículas. Sería de esperar, por ejemplo, que un tumor más grande incluya más células y por lo tanto libere más microvesículas que uno más pequeño. Esto se podría utilizar para supervisar una terapia, proporcionando un medio para medir un cambio en el tamaño de un tumor, que se puede reducir, crecer o permanecer igual. Tales métodos serían valiosos en la evaluación de la eficacia de una terapia en una población de pacientes como un conjunto, o en un paciente individual. También se contempla que la progresión de un cáncer y/o la respuesta a un tratamiento se pueden controlar mediante la medición de una
20 combinación de proteínas oncogénicas que se encuentran en las microvesículas. Por ejemplo, EGFR y HER-2 se pueden medir en combinación, por ejemplo, en el cáncer de mama, proporcionando de este modo una indicación del estado genético (por ejemplo, genotipo) y la progresión (o recurrencia) del tumor maligno, en algunos aspectos independientemente del tamaño real del tumor. También, HER-2 y HER-3 o HER-2 y EGFR se pueden medir en combinación, por ejemplo. Además, como las microvesículas pueden contener oncoproteínas intactas, en otra realización se puede determinar el estado de fosforilación de las oncoproteínas para supervisar o medir la eficacia de los tratamientos dirigidos. Por ejemplo, supervisar el estado de fosforilación de la combinación EGFR/HER-2 en microvesículas obtenidas a partir de un cáncer de mama, podría indicar la eficacia de un fármaco dirigido a HER-2 tal como Herceptin®, un fármaco dirigido a EGFR tal como Tarceva®, o tratamientos contra el cáncer similares, solos
30 o en combinación. Además, el entorno molecular que rodea una proteína oncogénica en las microvesículas, por ejemplo, otras moléculas, el proteoma completo o el fosfoproteoma, se pueden emplear para supervisar la progresión del cáncer y/o la eficacia de un tratamiento contra el cáncer. Por ejemplo, la presencia o ausencia o un estado de fosforilación de PTEN en las microvesículas puede ser indicativo de la progresión del cáncer y/o de la eficacia de un tratamiento contra el cáncer.

40 La invención tal y como se reivindica en el presente documento, proporciona métodos para supervisar la progresión de un cáncer y/o supervisar la eficacia de un tratamiento contra el cáncer o un régimen terapéutico. Se contempla que cualquier tratamiento contra el cáncer o régimen terapéutico conocido en la técnica se podría utilizar en los métodos descritos en el presente documento. Ejemplos no limitantes de tratamientos y regímenes terapéuticos incluidos en el presente documento, incluyen cirugía, radiología, quimioterapia y administración de terapias y tratamientos dirigidos contra el cáncer, que interfieren con mecanismos específicos implicados en la carcinogénesis y el crecimiento de tumores. Ejemplos no limitantes de terapias contra el cáncer dirigidas incluyen terapias que inhiben dianas asociadas a la tirosina cinasa (tales como Iressa®, CI-1033, Tarceva® y Gleevec®), inhibidores de sitios de unión a receptores extracelulares para hormonas, citocinas y factores de crecimiento (Herceptin®, Erbitux®), inhibidores de proteasoma (Velcade®) y estimuladores de la apoptosis (Genasense®). Tales terapias dirigidas se
50 pueden conseguir a través de moléculas pequeñas, anticuerpos monoclonales, antisentido, ARNs, aptámeros y terapia génica. Un sujeto puede recibir también una combinación de tratamientos o regímenes terapéuticos. Cualquier otro tratamiento o régimen terapéutico conocido en la técnica se puede utilizar en los métodos descritos en el presente documento, solo o en combinación con otros tratamientos o regímenes terapéuticos.

Aunque también se describen métodos de diagnóstico del cáncer, al permitir la detección de múltiples proteínas oncogénicas fosforiladas y/o múltiples sitios de fosforilación dentro de ellas, mediante la realización del análisis en las microvesículas, la presente invención proporciona métodos para supervisar la progresión de un cáncer y/o supervisar la eficacia de un tratamiento o un régimen terapéutico mediante la medición del estado de fosforilación de una proteína oncogénica en las microvesículas.

60 Los receptores de tirosinas cinasas (RTKs), tales como EGFR, contienen un dominio de unión a ligando extracelular conectado a un dominio citoplásmico a través de una única hélice transmembranal. El dominio citoplásmico contiene un núcleo de proteína tirosina cinasa conservado y secuencias reguladoras adicionales que están sujetas a una autofosforilación y fosforilación mediante proteínas cinasas heterólogas. Cuando un ligando se une al dominio

extracelular de un RTK, se activa la dimerización del RTK con otros RTKs adyacentes. La dimerización conduce a una rápida activación de los dominios de cinasa citoplásmica de las proteínas, siendo el primer sustrato para estos dominios el propio receptor. Como resultado, el receptor activado se autofosforila en múltiples residuos de tirosina intracelulares específicos. La fosforilación de residuos de tirosina específicos dentro del receptor activado crea sitios de unión para proteínas que contienen el dominio de homología 2 Src (SH2) y de unión a fosfotirosina (PTB). Las proteínas específicas que contienen estos dominios incluyen Src y la fosfolipasa Cy, y la fosforilación y la activación de estas dos proteínas después de la unión al receptor, conduce a la iniciación de las rutas de transducción de señales. Otras proteínas que interactúan con el receptor activado, actúan como proteínas adaptadoras y no tienen actividad enzimática intrínseca por sí mismas. Estas proteínas adaptadoras enlazan la activación de RTK con rutas de transducción de señales aguas abajo, tales como la cascada de señalización de la cinasa MAP. La actividad de prácticamente todos los RTKs se puede mejorar, incluso en ausencia de unión al ligando, mediante el tratamiento de las células con inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa. Por tanto, la activación persistente de un RTK o un receptor oncogénico, que desencadena una expresión anormal de genes implicados en la proliferación celular, la supervivencia y la angiogénesis, está regulada positivamente por uno o varios sitios de fosfotirosina en el bucle de activación.

La fosforilación de RTKs se puede medir utilizando una serie de métodos. Ejemplos no limitativos de tales métodos incluyen anticuerpos fosfoespecíficos, matrices de fosfoanticuerpo, tinción con anticuerpos contra residuos de fosfotirosina y ensayos directos de cinasas con sustratos que se pueden fosforilar. Otra manera de determinar el estado de fosforilación de múltiples receptores sobre las microvesículas podría ser evaluar su fosfoproteoma total usando métodos relacionados con el espectrómetro de masas (MS). Se contempla que las técnicas convencionales conocidas en la técnica para medir y detectar proteínas fosforiladas (también denominadas fosfoproteínas) y el estado de fosforilación de una proteína, se pueden utilizar en los métodos descritos en el presente documento.

También se describe adicionalmente en este documento que la transformación oncogénica puede tener un impacto sobre una célula cancerígena de manera que se causa un cambio en el espectro más amplio de las proteínas asociadas con MVs, cuyos enlaces con el oncogén desencadenante pueden ser mecánicamente obvios o no, pero pueden ser significativos para un uso como biomarcadores. Por lo tanto, en este documento se describe la identificación de proteínas asociadas con el cáncer presentes en MVs circulantes de ratones que albergaban xenoinjertos de tumores humanos subcutáneos o en las MVs procedentes del medio de cultivo de líneas celulares tumorales humanas. Estas proteínas representan biomarcadores que se pueden utilizar, por ejemplo, para controlar la progresión de un tumor o la respuesta frente a una terapia anti-tumoral. Los biomarcadores también se pueden utilizar para el diagnóstico y el pronóstico de un tumor en un sujeto. Se demuestra en la presente memoria que muchas proteínas relacionadas con tumores malignos, tales como oncogenes, supresores tumorales, receptores de tirosinas cinasas y mediadores de la señalización celular, se detectan en las MVs obtenidas a partir de varios tipos de células cancerosas humanas. Ejemplos de tales proteínas asociadas con el cáncer y de fosfoproteínas que se encuentran en las MVs obtenidas a partir de tumores que se pueden utilizar como biomarcadores, se indican en las Tablas 1-4 a continuación.

Se debe tener en cuenta que las proteínas y fosfoproteínas asociadas al cáncer que se encuentran en las MVs incluyen tanto proteínas oncogénicas conocidas, tales como HER-2 como proteínas inesperadas, tales como VEGFR2 o Tie 2, que son receptores angiogénicos que normalmente se encuentran en las células epiteliales. Por lo tanto, el análisis del contenido proteico de las MVs obtenidas a partir de tumores, tal y como se muestra en el presente documento, ayudará a la caracterización, el pronóstico y el diagnóstico de tumores, incluyendo las complejidades de su microambiente y el estroma del hospedador. Una determinación del contenido en proteínas de las MVs obtenidas a partir de tumores también puede conducir a la identificación potencial de nuevas dianas terapéuticas. Por ejemplo, la fosfoproteína VEGFR3 humana se identificó en las MVs de ratones que eran portadores de xenoinjertos de PANC-1, lo que sugiere que la fosfoproteína VEGFR3 asociada a células de cáncer puede ser un biomarcador hasta ahora no apreciado y/o una diana terapéutica para al menos un subconjunto de los cánceres pancreáticos (véase la Tabla 4). Además, la combinación de proteínas presentes en las MVs puede ser característica del tumor a partir del cual se obtienen las MVs (véase la Tabla 4, por ejemplo). Por lo tanto, el perfil proteico o fosfoproteico, o un subconjunto de los mismos, de las MVs se puede utilizar en los métodos proporcionados en este documento, por ejemplo, para el seguimiento de una terapia anti-tumoral o para el diagnóstico o el pronóstico de un tumor.

Como muchas de las proteínas identificadas en este documento son fosfoproteínas que son conocidas por estar activadas o inactivadas mediante fosforilación, la activación o el estado funcional de las proteínas asociadas al cáncer se puede evaluar mediante un seguimiento de su estado de fosforilación. Por tanto, el estado de fosforilación de las proteínas asociadas con MVs, solas o en combinación, también se puede utilizar en los métodos proporcionados en este documento, por ejemplo, para el seguimiento de una terapia anti-tumoral o para el diagnóstico o el pronóstico de un tumor.

Debe entenderse que las proteínas y fosfoproteínas asociadas con MVs identificadas en el presente documento y combinaciones de las mismas, se pueden usar en los métodos y kits descritos en este documento.

En un aspecto, se proporciona en la presente memoria un análisis de sangre basado en las microvesículas, en donde las MVs se aíslan a partir de una muestra de sangre de un sujeto y se someten a ensayo las proteínas

asociadas con MVs, o se someten a ensayo para evaluar el estado de fosforilación de las proteínas asociadas con MVs. Tales métodos se demuestran a continuación, por ejemplo, en las MVs que expresan EGFRvIII y EGFR de tipo silvestre, en los ratones que son portadores de un xenoinjerto de una línea celular tumoral humana y en pacientes con glioblastoma (GBM). Se ha demostrado la viabilidad de este enfoque en numerosos tipos de células cancerígenas (como cáncer de mama, glioma, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de próstata y cáncer colorrectal).

Se observa que otra ventaja potencial del uso de MVs circulantes en lugar de una muestra de biopsia, es el problema de la heterogeneidad tumoral: se ha observado en una ocasión que una muestra de biopsia tumoral era negativa para EGFRvIII, mientras que la correspondiente muestra de MV de la sangre era positiva (véase el Ejemplo 3). Por lo tanto, mediante la obtención de una muestra de biopsia de tejido que no es representativa del fenotipo/genotipo tumoral general, el resultado es engañoso, mientras que la muestra de sangre es representativa de todo el tumor y por lo tanto más fiable.

En el presente documento se describen métodos para detectar la presencia de una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor en un tumor en un sujeto, en donde las MVs se aíslan a partir de una muestra de un fluido corporal, por ejemplo, sangre, procedente del sujeto y se somete a ensayo la proteína oncogénica o relacionada con un tumor, y en donde la presencia de la proteína en las MVs indica la presencia de la proteína en el tumor. En algunos casos, los métodos descritos en este documento pueden detectar una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor que no se detecta en una muestra de biopsia del sujeto. Estos métodos pueden ser particularmente útiles para el análisis de tumores heterogéneos, en donde una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor se puede perder por los métodos de biopsia tisular convencionales y la toma de muestras histopatológicas. Por ello, los métodos proporcionados en este documento reducen o eliminan el riesgo de no detectar una proteína oncogénica o relacionada con un tumor en una muestra de biopsia obtenida a partir de un sujeto. Estos métodos también proporcionan una alternativa no invasiva a la biopsia tisular.

Además, se describen métodos para detectar un cáncer en un sujeto, en donde una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor se detecta en microvesículas obtenidas a partir de una muestra de fluido corporal, por ejemplo, sangre, recogida del sujeto. En una realización, dicha proteína oncogénica o relacionada con el tumor no se detecta en una muestra de biopsia obtenida a partir de dicho sujeto. También, se describen métodos para detectar un cáncer metastásico en un sujeto, en donde una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor se detecta en microvesículas obtenidas a partir de una muestra de fluido corporal, por ejemplo, sangre, recogida a partir del sujeto. En algunos casos en los que es poco práctico o imposible obtener muestras de biopsias de todos los sitios de metástasis en un sujeto, el análisis de las microvesículas se puede utilizar para determinar la presencia de proteínas oncogénicas o relacionadas con un tumor en los tumores y/o para reducir o eliminar el riesgo de no detectar una proteína oncogénica o relacionada con un tumor.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para determinar el estado de fosforilación de una proteína oncogénica o una proteína relacionada con un tumor en un tumor en un sujeto, que comprende recoger una muestra de un fluido corporal del sujeto; aislar las microvesículas de la muestra; y detectar el estado de fosforilación de la proteína oncogénica o la proteína relacionada con un tumor en las microvesículas, en donde el estado de fosforilación de la proteína oncogénica o la proteína relacionada con un tumor en las microvesículas indica el estado de fosforilación de la proteína oncogénica o la proteína relacionada con un tumor en el tumor. En un aspecto, el fluido corporal es sangre.

Además, se describen métodos para diagnosticar o determinar el pronóstico de un cáncer en un sujeto, que comprenden recoger una muestra de un fluido corporal, por ejemplo, sangre, desde el sujeto; aislar las microvesículas de la muestra; y determinar las proteínas oncogénicas y/o relacionados con el tumor en las microvesículas.

En un aspecto, las proteínas oncogénicas, relacionadas con un tumor y/o asociadas con MVs en las microvesículas, es un diagnóstico, por ejemplo, del tipo de cáncer, y/o un pronóstico.

La presente invención se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan para ilustrar la invención, en lugar de para limitar su alcance.

EJEMPLO 1

Cultivo celular y aislamiento de microvesículas (MVs)

Células U373 (astrocitoma humano), su variante estable U373vIII que expresa EGFRvIII regulada con Tet-off o EGFRvIII fusionada en el extremo C-terminal con el casete de proteína fluorescente verde (pEGFPNI) (U373vIII-GFP) y A431 se mantienen como se ha descrito previamente (Viloria-Petit et al. Am. J. Pathology, 1997, 6:1523-1530; Yu et al., 2005, Blood, 105: 1734-1741) en medio que contiene suero bovino fetal, FBS, con agotamiento de microvesículas. Las células HUVEC se mantienen en EGM-2 (Cambrex Bioscience, Walkersville, MD, EE.UU.). Las microvesículas se recogen a partir de medios condicionados o plasma de ratón, como se ha descrito previamente (Yu & Rak, J. Thromb. Haemost, 2004, 2:2065-67; Al-Nedawi et al., 2005, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol., 25: 1744-1749). Brevemente, los medios se someten a dos centrifugaciones sucesivas a 300 g y 12.000 g para eliminar

- las células y los residuos. Las microvesículas se sedimentan por ultracentrifugación durante 2 horas a 100.000 g y se cuantifican mediante el contenido en proteína y se analiza el contenido en EGFR o EGFRvIII. Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), las células se cultivan sobre cubreobjetos, se fijan con 2,5% de glutaraldehído, se tiñen con 1% de OsO₄, se cubren con oro y se visualizan usando el instrumento JEOL 840A. Para un análisis *in vivo*, los tumores se generan mediante una inyección de 1-10 x 10⁶ células U373vIII o U373 en ratones inmunodeficientes (SCID) (Charles River, Canadá). En algunos casos, los ratones se tratan diariamente con el inhibidor de pan-ErbB, CI-1033, como se ha indicado. Se recoge la sangre de los ratones portadores de tumor o de los ratones de control mediante una punción cardiaca en jeringas heparinizadas. El plasma exento de plaquetas se utiliza para preparar las microvesículas.
- La citometría de flujo (FACS) se emplea para detectar EGFRvIII o EGFRvIII-GFP en la superficie de células no permeabilizadas viables y se lleva a cabo ya sea con células que expresan estos receptores de forma endógena, o con las que han adquirido tal expresión después de la transferencia de microvesículas. Típicamente, las células U373 se tratan con microvesículas (MVs) obtenidas a partir de células U373vIII o U373vIII-GFP durante 24 horas. Las células se separan después, usando EDTA 2 mM (ácido etilendiaminotetraacético) para obtener una suspensión de células individuales, cuyas partes alícuotas (1,5 x 10⁶/muestra) se lavan en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 1% de FBS y 0,1% de azida de sodio. Las células tratadas con MVs obtenidas a partir de U373vIII, se tiñen a continuación durante 30 minutos a 4°C, por ejemplo, con un anticuerpo monoclonal contra EGFRvIII (Zymed). Después del lavado, las muestras se incuban con anticuerpo secundario de cabra anti-ratón Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 30 minutos a 4°C, se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se analizan. En el caso de un tratamiento con MVs obtenidas a partir de células U373vIII-GFP, suspensiones de células de nuevo aporte se analizan directamente en busca de fluorescencia de GFP. Los datos se pueden adquirir utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA).

- Todos los experimentos *in vivo* se realizan en ratones con una edad de 6 a 8 semanas con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) (Charles River, Saint-Coustant, QC, Canadá). Brevemente, 1 a 10 x 10⁶ células U373vIII o U373, se inyectan por vía subcutánea en 0,2 ml de PBS. Se recoge sangre de los ratones mediante punción cardiaca, en una solución de heparina sódica. El plasma exento de plaquetas se prepara mediante centrifugación a 2000 g durante 5 minutos, 2000 g durante 5 minutos y 16.000 g durante 5 minutos para aislar las microvesículas.

Ejemplo 2

Ensayos de transferencia de microvesículas

- Las células U373 (ceptoras) se tratan con microvesículas durante 24 horas y una suspensión de células individuales se analiza por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia para estudiar la expresión de EGFRvIII o GFP. Para detectar los eventos de señalización, las U373 se privan de nutrientes en 0,5% de FBS (DMEM) antes de la adición de las microvesículas, que están o bien intactas o se han preincubado con anexina-V, o CI-1033, a las concentraciones que se indican. La expresión de moléculas asociadas con las microvesículas (EGFRvIII, TF) y la expresión de MAPK total y activada y Akt, así como otros cambios, se somete a ensayo mediante inmunotransferencia (BclXL, p27/Kip1), ELISA (VEGF, R&D Systems), o ensayos de actividad de promotor (VEGF), como se describe en otra parte (Lopez-Ocejo et al. 2000, Oncogene, 40:4611-4620). Para los ensayos de formación de colonias sobre agar blando, se preparan suspensiones de células individuales en 0,3% de agarosa a partir de un número igual de células pretratadas con microvesículas o medio de control. Los cultivos se establecen en placas recubiertas previamente con 0,5% de agarosa y se hace un recuento de todas las colonias que contienen más de 4 células.

Ejemplo 3

Detección de EGFRvIII circulante en pacientes con glioblastoma multiforme

- Las microvesículas se recogen a partir de plasma humano de una manera similar a como se ha descrito previamente para el plasma de los ratones portadores de tumores (Al-Nedawi et al., 2008, Nature Cell Biology, 10: 619-624). Brevemente, muestras de sangre archivada son sometidas a dos centrifugaciones consecutivas a 300 g durante 5 minutos y después a 12.000 g durante 20 minutos para eliminar las células y los residuos. Finalmente, las microvesículas se obtienen después de una centrifugación durante 2 horas a 100.000 g, se lavan dos veces con un gran volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los lisados de proteínas se preparan en el tampón de lisis que contiene: Tris 10 mM, pH 6,8, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, 2% (peso/vol) de SDS, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM, durante 10 minutos sobre hielo. A menos que se indique lo contrario, los lisados se determinaron mediante SDS-PAGE y se sometieron a inmunotransferencia, por ejemplo, con un anticuerpo policlonal anti-EGFR humano de ratón o de oveja, o anticuerpos monoclonales de ratón apropiados. La inmunodetección se logra usando el anticuerpo secundario apropiado conjugado con HRP y el kit de quimioluminiscencia (kit ECL; Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, Reino Unido), después de lo cual las transferencias se escanean y las bandas de proteínas se cuantifican utilizando, por ejemplo, el escáner Storm 860 (GE Healthcare). Las bandas tanto de EGFR de tipo silvestre como de EGFRvIII se detectan de esta manera en los tamaños esperados y se determinan usando un protocolo convencional de SDS-PAGE.

- La oncoproteína EGFRvIII también se detectó en MVs circulantes recogidas a partir de una cohorte de 24 pacientes con GBM procedente del Banco de Tumores de Toronto, utilizando análisis Western (Fig. 8). La detección de la oncoproteína en las MVs se correlacionaba bien con la detección del oncogén EGFRvIII en muestras tumorales de los mismos pacientes (Fig. 8). Estos resultados demuestran la viabilidad de la detección de la oncoproteína en MVs circulantes en pacientes con cáncer. En particular, para el paciente n° 4 se detectó la oncoproteína en MVs a pesar de que el oncogén no se había detectado en la muestra de tumor usando PCR. Este resultado indica que en algunos casos el análisis de las MVs puede ser más sensible que la PCR para la detección de biomarcadores asociados con el cáncer, tales como EGFRvIII. También es posible que la señal de EGFR relacionada con las MVs pudiera haber surgido de células tumorales que no se habían eliminado y que se esperaba que causarían una recurrencia.
- Se detectó la señal de EGFR en las MVs recogidas a partir de sangre de ratones SCID portadores de un xenoinjerto humano, usando un ensayo de ELISA (Fig. 9). Un kit comercial para ELISA de EGFR (R&D, Systems, DYC 1854-5) que contenía el anticuerpo anti-EGFR que tenía una reacción cruzada con EGFRvIII, se utilizó para detectar EGFRvIII en las MVs de ratones que eran portadores de xenotrasplantes de células U373vIII obtenidas a partir de un glioma y EGFR de tipo silvestre en células A431 obtenidas a partir de un carcinoma de células escamosas (SCC). Estos resultados indican que ambas formas de EGFR se detectan fácilmente mediante un ensayo ELISA y confirman la viabilidad de la detección de biomarcadores basándose en las MVs.

Ejemplo 4

Detección de múltiples dianas moleculares relacionadas con el cáncer en las MVs

- Se aislaron microvesículas liberadas por las líneas de células tumorales humanas en medio de cultivo y se utilizó el análisis Western para detectar diversas proteínas relacionadas con tumores malignos, tales como oncogenes, supresores tumorales y mediadores de la señalización celular, en la carga de las microvesículas. Se utilizaron líneas celulares de glioma (U373, U373vIII, U87 y U87vIII), células de cáncer de pulmón (A549), células de cáncer de mama (MDA-MB-231), células de cáncer de próstata (PC-3) y células de cáncer colorrectal (DLD-1, HCT116 y CaCo2). Las oncoproteínas putativas K-ras, c-Met, beta-catenina y PDGFR y los productos génicos supresores de tumores PTEN, TP53 y E-cadherina se sometieron a ensayo en las microvesículas. Los resultados se muestran en la Fig. 10A, en donde (+) indica reactividad fuerte, (+/-) indica reactividad débil y (-) indica que no hay reactividad detectable. Ejemplos de análisis de transferencia Western se muestran en la Fig. 10B.

- El análisis de transferencia Western se realizó en lisados celulares totales de preparaciones de MVs, obtenidas a partir de las líneas celulares cultivadas, como se ha indicado. Los anticuerpos utilizados eran los siguientes: Pan Ras: monoclonal de conejo [Y131], n° de cat. (ab32442), Abcam; K-ras: Ac. monoclonal de ratón, n° de cat. AT2650a, Biolynx Inc.; C-Met: monoclonal de conejo (EP145Y), n° de cat. (ab51067), Abcam; PDGFR-b2: monoclonal de ratón, n° de cat. (ab10847-100), Abcam; Beta-catenina: monoclonal de ratón, n° de cat. (MA 1-301), ABR; E-cadherina: monoclonal de ratón [MB2], n° de cat. (ab8993), Abcam; PTEN: monoclonal de conejo, n° de cat. (#9188), Cell Signaling; P53: monoclonal de conejo, n° de cat. (#2527), Cell Signaling. Se observa que las líneas celulares utilizadas en este estudio representan poblaciones que actualmente se utilizan en el laboratorio y que se obtienen a partir de diversas fuentes (ATCC, colaboradores), y por tanto pueden diferir en su estado molecular de líneas celulares denominadas de forma similar, conservadas en otro lugar.

- Estos resultados muestran el gran alcance de dianas moleculares de interés para el cáncer que están presentes y son detectables en las MVs. Por ejemplo, RTKs fosforilados asociados con MVs *in vivo*, se pueden detectar. Los resultados también muestran que se puede analizar de esta manera una variedad de tipos de tumores humanos.

Ejemplo 5

Demostración del estado funcional sostenido (fosforilación/activación) de proteínas relacionadas con el cáncer asociadas a MVs

- Se han detectado, *in vitro*, múltiples fosfo-RTKs en microvesículas liberadas en el medio de cultivo por varios tipos de líneas celulares tumorales humanas, usando una matriz de anticuerpos para fosfoproteínas que contiene sondas para 42 RTKs (R&D Systems) (Fig. 11). La Fig. 11A muestra ejemplos de RTKs en los que se puede detectar simultáneamente una fosforilación relativa en una única muestra usando la matriz de anticuerpos para fosfo-RTKs; la matriz tiene 119 puntos y se pueden detectar 42 RTKs fosforilados diferentes. La Fig. 11B muestra los fosfo-RTKs importantes detectados en las MVs de las líneas celulares indicadas. Ejemplos de los resultados del ensayo se proporcionan en la Fig. 11C. Los resultados indican que se pueden detectar numerosas fosfoproteínas asociadas con MVs. Las principales fosfoproteínas asociadas con MVs incluyen, por ejemplo, EGFR, FGFR3, EphB2, ROR1, EphA2 y EphA4.

- Las líneas celulares utilizadas en este estudio representan poblaciones que actualmente se utilizan en el laboratorio y que se obtienen a partir de diversas fuentes (ATCC, colaboradores) y por lo tanto pueden diferir en su estado molecular de líneas celulares con nombres similares conservadas en otros lugares. Además, se observa que los resultados obtenidos dependen de los anticuerpos específicos utilizados para esa detección y los fosfo-epítomos a los que se dirigen. Los anticuerpos utilizados en la matriz son únicos y pueden tener una reactividad no solapante con otros anticuerpos fosfo-específicos dirigidos a los mismos RTKs.

Estos resultados demuestran que los receptores de tirosinas cinasas (RTKs) contenidos en las microvesículas de células cancerosas han facilitado la fosforilación y, por lo tanto, tienen una activación sostenida y un estado funcional.

5 También se realizaron perfiles *in vitro* a gran escala de fosfoproteínas contenidas o enriquecidas en MVs liberadas desde las células de GBM dirigidas con EGFRvIII. Se empleó una micromatriz de anticuerpos Kinex® compuesta por más de 650 anticuerpos diferentes, específicos del sitio fosfo para realizar el perfil de la expresión proteica de la señalización celular y la fosforilación (Kinexus, Inc.). La matriz puede detectar 248 sitios únicos de fosforilación con anticuerpos fosfo-específicos, 121 sitios de fosforilación de cinasas, 2 sitios de fosforilación de fosfatasas y 125 sitios de fosforilación en subunidades reguladoras y otras proteínas. Empleando la micromatriz de anticuerpos Kinex®, se analizó el fosfoproteoma de MVs producidas por células de GBM humanas. Con el fin de identificar los cambios dependientes de EGFRvIII en el fosfoproteoma de las MVs, se emplearon tanto células U373P (también denominadas U373 parentales) (no transfectadas, no tumorigénicas) y células U373vIII. En cada caso, los valores obtenidos a partir de las MVs se normalizaron respecto a los valores obtenidos a partir de las células. Los resultados ejemplares se proporcionan en las Tablas 1 y 2 a continuación, en donde la fosfoproteína (P-Proteína) se indica en la columna de la izquierda y la señal media neta normalizada (NNMS) se indica en la columna de la derecha. Las proteínas más abundantes encontradas en las MVs se muestran en las Tablas 1 y 2. La Tabla 3 proporciona ejemplos adicionales de fosfoproteínas detectadas en U373-MVs utilizando la matriz de anticuerpos Kinex®; estas proteínas representan una muestra de las más de 200 fosfoproteínas detectadas. La Tabla 3.1 muestra que la fosforilación de sitios distintos, por ejemplo, Y1068 o Y1110 de EGFR, se puede supervisar en las MVs.

10

15

20 Los resultados indican que hay numerosas proteínas fosforiladas, y por lo tanto activadas, en las MVs, muchas de las cuales se sabe que tienen una función y/o un valor predictivo en el cáncer. Además, los resultados presentados en este documento usando tanto la matriz de anticuerpos Kinex® como la matriz de anticuerpos de fosfoproteínas de R&D Systems, muestran que múltiples dianas moleculares oncogénicas, de señalización y biológicamente activas se pueden detectar simultáneamente en las MVs obtenidas a partir de células de cáncer, tanto las MVs recuperadas a partir de un medio de cultivo celular condicionado como las MVs recuperadas a partir de la sangre de ratones que albergaban xenoinjertos de tumores humanos.

25

Tabla 1. Matrices Kinex® - Fosfoproteínas asociadas con MVs con la señal media normalizada neta más alta (células U373P frente a U373P-MVs).

P-Proteína	Señal media neta normalizada NNMS
BLNK	5079
BAD	8520
CrystalliaB	8499
eIF4E	6455
MKK1	6244
PKB/Akt	5505
PKCg	5316
PLcg1	5025
Receptor de progesterona	5013
VEGFR2(KDR) Y1214	5065
VEGFR2(KDR) Y1214	5252
ZAP70/Syk	7160
ZAP70/Syk	7031

30 Tabla 2. Matrices Kinex® - Fosfoproteínas asociadas con MVs con la señal media normalizada neta más alta (células U373vIII frente a U373vIII-MVs).

P-Proteínas	NNMS
MEK1	6003
MEK	8459

ES 2 683 362 T3

P-Proteínas	NNMS
MARCK	6202
Tau (mtub)	5270
IRS1	5064
IRS1	5947
Ret	5861
Jun	8782
Jun	6743
BAD	12142
BAD	5055
Erk-1	5314
MKK1	9113
HER-2	6389
HER-2	6252
HER-2	5779
HER-2	5399
PKCd	9078
PKCg	14431
PKCg	5999
PKCg	15696
PKCg	17197
PKCg	7949
PKCg	7013
Tau	5264
Tau	5117
Chk2	6002
EGFR	5929
EGFR	5958
EGFR	5250
VEGFR2	5117
Zap70/Syk	8242
Zap70/Syk	5796
FAK	5242
BLNK (lin)	11480

Tabla 3. Ejemplos de fosfoproteínas detectadas en U373-MVs.

Códigos de anticuerpos	Nombre de la proteína diana	Sitio fosforilación (humano)	de	Nombre completo de la proteína diana	NNMS
PN011	Bad	S91		Antagonista de Bcl2 de la proteína de muerte celular	8520,4

ES 2 683 362 T3

Códigos de anticuerpos	Nombre de la proteína diana	Sitio de fosforilación (humano)	Nombre completo de la proteína diana	NNMS
N024	CREB1	S133	Proteína que se une al elemento de respuesta AMPc	4935,8
PK121	EGFR*)	T693	Receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	4807,0
PN030-1	eIF4E	S209	Factor de iniciación de la traducción eucariota 4 (proteína que se une a la caperuza de ARNm)	6554,6
PK125	ErbB2 (HER2)	Y877	Receptor de tirosina cinasa de ErbB2 (Neu)	4922,7
PK014-PK015-2	Erk1	T202+Y204; T185/Y187	Proteína serina cinasa 1 regulada extracelularmente (cinasa p44 MAP)	4199,1
PK019-1	FAK	Y577	Proteína tirosina cinasa de adhesión focal	3457,4
PN048-1	Jun	S73	Proto-oncogén Jun codificado por el factor de transcripción AP1	5879,4
PK046-3	MEK1	T291	Proteína serina cinasa 1 MAPK ERK (MKK1)	6244,5
PK116	mTOR (FRAP)	S2448	Diana de mamífero de rapamicina (FRAP)	1183,9
PN053	NFkappaB p65	S276	Factor de transcripción nuclear NF-kappa-B p65	1503,1
PK060-3	P38a MAPK	T180+Y182	Proteína serina cinasa activada con mitógeno p38 alfa	1171,6
PK063	PDGFRa	Y754	Receptor de cinasa alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas	2315,3
PK065	PDGFRb	Y716	Receptor de cinasa beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas	3369,6
PK073	PKCa	S657	Proteína serina cinasa C alfa	3019,3
PK079	PKCd	S645	Proteína serina cinasa C delta	4061,2
PK082-2	PKCg	T514	Proteína serina cinasa C gamma	4857,1
NN143	PLCg2	Y753	1-fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato fosfodiesterasa gamma-2	2472,8
PN104	Receptor de progesterona	S294	Receptor de progesterona	5013,0
PP003	PTEN	S380+S382+ S385	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa y proteína fosfatasa y homólogo de tensina delecionados en el cromosoma 10	1623,7
PK098	Raf1	S259	Proteína serina cinasa codificada por el proto-oncogén Raf1	2463,0
PN065	Rb	T356	Proteína 1 asociada a retinoblastoma	1331,6
PN074-2	Shd	Y349+Y350	Proteína transformante 1 que contiene el dominio SH2	2088,9
PN077	SOX9	S181	SRY (región determinante del sexo Y) -caja 9 (displasia campomélica, reversión sexual autosómica)	3355,7
PN078	STAT1	S727	Transductor de señal y activador de transcripción 1	2016,7
PK110	VEGFR2 (KDR)	Y1054	Receptor de tirosina cinasa 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (Flk1)	3542,7
	Histona H1	Sitios CDK1 de fosforilación	Histona H1 fosforilada	663,2
	P27 Kip1	S10	Inhibidor de cinasa 1 B dependiente de ciclina	27,9

Códigos de anticuerpos	Nombre de la proteína diana	Sitio de fosforilación (humano)	Nombre completo de la proteína diana	NNMS
			p27	
	Histona H2A.X	S139	Variante X de la histona H2A	1558,5
	BRCA1	S1423	Proteína de susceptibilidad de cáncer de mama de tipo 1	4698,6
	Hsp27	S15	Proteína de choque térmico de 27 kDa beta 1 (HspB1)	1428,5
	Lck	S157	Proteína tirosina cinasa específica de linfocitos	2049,3
	Caveolina 2	S36	Caveolina 2	977,9
	p53	S392	Proteína p53 supresora tumoral (antígeno NY-CO-13)	1535,4
	IRS1	S639	Sustrato 1 del receptor de insulina	5064,2
	Ret	S696	Receptor de tirosina cinasa Ret	5861,1
	Rac1	S71	Sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras	2791,5
	FAK	S843	Proteína tirosina cinasa de adhesión focal	4081,5
	SMC1	S957	Mantenimiento estructural de la proteína 1A de cromosomas	470,1
	Integrina α 4	S988	Integrina alfa 4 (VLA4)	2846,1
	p38a MAPK	T180+Y182	Proteína serina cinasa p38 alfa activada por mitógeno	1817,2
	MLK3	T277+S281	Proteína serina cinasa 3 de linaje mixto	2096,6
	PKBa (Akt1)	T308	Proteína serina cinasa B alfa	2339,6
	RSK 1/3	T359+S363/ T356+S360	Proteína serina cinasa 1/3 ribosómica S6	130,0
	MEK1 (MAP2K1)	T385	Proteína serina cinasa 1 MAPK/ERK (MKK1)	4256,4
	Chk2	T68	Proteína serina cinasa "Checkpoint" 2	6002,0
	IR/IGF1R (INSR)	Y1189/1190	Receptor de insulina/receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1	3420,7
	Met	Y1230+Y1234+Y1235	Receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)	2459,8
	CDK1/2	Y15	Proteína serina cinasa 1/2 dependiente de ciclina	4737,5
	Lck	Y191	Proteína tirosina cinasa específica de linfocitos	2272,8
	Shc1	Y239	Proteína 1 transformante que contiene el dominio SH2	2557,0
	GSK3a	Y279/Y216	Sintasa de glucógeno-serina cinasa 3 alfa	4249,1
	Src	Y529	Proteína tirosina cinasa codificada por el proto-oncogén Src	3564,0
	Kit	Y703	Receptor de tirosina cinasa de kit/factor Steel	1653,3
	IR (INSR)	Y972	Receptor de insulina	2594,7
*) de acuerdo con la invención				

Tabla 3.1. Kinex® - Ejemplos de detección redundante y no redundante de sitios de fosforilación del receptor (EGFR) en MVs liberadas por células de cáncer (U373) (todos los ejemplos son de acuerdo con la invención).

Nombre de la proteína diana	Sitio de fosforilación (humano)	Nombre de la proteína diana completa	NNMS
EGFR	T693	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	4807,0
EGFR	Y1110	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	3966,1
EGFR	Y1110	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	3806,9
EGFR	Y1197	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	3521,4
EGFR	Y1197	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	1971,5
EGFR	T678	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	4535,8
EGFR	T678	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	4001,3
EGFR	T693	receptor de tirosina cinasa del factor de crecimiento epidérmico	5929,1

Estos resultados indican el espectro de tipos de moléculas que se pueden encontrar en las MVs en forma fosforilada. Si bien este es un ensayo *in vitro*, se observa que el espectro de cambios relacionados con oncogenes en las MVs (algunos de los cuales pueden estar asociados con MVs pero no ser necesariamente oncogénicos) es inesperadamente grande.

Los resultados también muestran que no solo se puede determinar la fosforilación-desfosforilación, sino que también se puede supervisar el estado de distintos sitios de fosforilación (por ejemplo, Y1068 o Y1110 del EGFR), que son responsables de diferentes funciones de la molécula (interacciones con diferentes dianas, reciclado, etc.). Esta información es fácilmente asequible a partir del análisis de las MVs, aunque sería difícil y tal vez no sea posible, obtener esta información usando un análisis comparable de muestras tumorales.

Ejemplo 6

Determinación de perfiles de fosfoproteínas de MVs circulantes en ratones con xenoinjertos de tumores humanos

A continuación, los perfiles de fosfoproteínas humanas de MVs que circulan en la sangre de ratones que albergaban xenoinjertos de tumores humanos, se analizaron *in vivo* (Tabla 4; Figura 12). Los xenoinjertos de las líneas celulares de cáncer humano indicadas, se generaron en ratones SCID mediante una inoculación subcutánea de células. Se permitió que se formaran los tumores. Cuando los tumores alcanzaron el punto final de 17 mm de diámetro, se sacrificaron los ratones y las MVs se aislaron a partir de plasma agrupado de ratones portadores de 4-5 tumores. El material lisado de proteínas se generó y se empleó para rastrear la matriz de anticuerpos anti-fosfoproteínas de RTKs humanos de R&D Systems.

Los resultados se proporcionan en la Tabla 4 a continuación y un ejemplo del ensayo con RTKs para MVs circulantes procedentes de ratones con un xenoinjerto A431, se muestra en la Fig. 12. Los resultados muestran que múltiples RTKs fosforilados están contenidos en MVs circulantes en ratones que albergan xenoinjertos de tumores, representativos de varios tipos de tumores humanos, tales como tumores de mama, colon, páncreas, próstata, pulmón, piel y cerebro, y que estos RTKs fosforilados se pueden detectar fácilmente en las MVs.

Tabla 4. Perfiles de fosfoproteínas de MVs que circulan en la sangre de ratones que son portadores de xenoinjertos de tumores humanos.

Línea celular	Tipo de tumor	Fosfoproteínas detectables
U373vIII	glioblastoma	EGFR, ErbB3, ErbB4 , FGFR1, FGFR4, InsulinR IGF-1R Dtk, Mer, MSPR, c-Ret ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, TrkA, TrkB, VEGFR1, VEGFR3, EphA 1, EphA7, EphB2, EphB4
U87	glioblastoma	EGFR, ErbB2, ErbB4, FGFR1, FGFR2a, InsulinR, IGF-1R, Dtk, Mer, MSPR, PDGFRb, SCFR, c-Ret, Tie-2, TrkA, TrkB, TrkC, VEGFRVEGFR2 VEGFR3, EphA7, EphB1, EphB2, EphB4, EphB6

Línea celular	Tipo de tumor	Fosfoproteínas detectables
U87vIII	glioblastoma	EGFR, ErbB2, ErbB4 , FGFR1, FGFR2a, Dtk, Mer, MSPR, c-Ret, ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, TrkA, TrkB, TrkC, VEGFR3, EphA6, EphA7, EphB1, EphB2
A549	cáncer de pulmón	EGFR, ErbB2, InsulinR, IGF-1R, Dtk, Mer, MSPR, c-Ret, ROR1, Tie-2, TrkA, EphA4, EphA7, EphB2,
A431	carcinoma de células escamosas	EGFR, ErbB2, ErbB4 , FGFR1, FGFR2a, FGFR3 InsulinR, Dtk, Mer, MSPR, c-Ret, ROR1, ROR2, Tie-1, TrkC, EphA1,
MDA-MB-231	cáncer de mama	EGFR, ErbB2, InsulinR. IGF-1R, Dtk, Mer, MSPR, c-Ret, ROR1, Tie-1, Tie-2, TrkB, EphA1, EphA7, EphB2
PC-3	cáncer de próstata	EGFR, ErbB2, ErbB4, FGFR1, FGFR3, IGF-IR, Dtk, Mer, MSPR, PDGFRb, ROR1,ROR2, Tie-1 Tie-2, TrkA, TrkB, TrkC, VEGFR1, EphB4
PANC-1	cáncer de páncreas	EGFR, ErbB2, ErbB4, FGFR1, FGFR2a, InsulinR, IGF-1R, Ax1, Dtk, Mer: HGFR, MSPR, PDGFRa, SCFR, Flt-3 M-CSFR, c-Ret ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, TrkA. TrkC, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, MuSK, EphA1, EphA4, EphA6, EphA7, EphB2, EphB4, EphB6
DLD-1	cáncer de colon	EGFR, InsulinR, IGF-1R, Axl. Dtk, MSPR c-Ret, ROR1, ROR2, Tie-1, Tie-2, TrkC, EphA7, EphB2
HCT116	cáncer de colon	EGFR, ErbB2 , ErbB4, FGFR1, FGFR4, InsulinR, IGF-IR, Dtk, Mer MSPR, PDGFRb, M-CSFR, c-Ret ROR1, ROR2 Tie-1, Tie-2, TrkA. TrkB, TrkC, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, MuSK, EPhA4, EphA6, EphA7, EphB1, EphB2, EphB4, EphB6
CaCo2	cáncer de colon	EGFR, ErbB2. InsulinR, IGF-1R, Dtk, Mer, MSPR, c-Ret ROR1, Tie-1, TrkB, TrkC, EphA1, EphA7, EphB2

Ejemplo 7

Demostración de que el estado de fosforilación de RTKs asociados con MVs es sensible a una terapia dirigida

5 Con el fin de determinar si las MVs se pueden utilizar como biomarcadores para supervisar la respuesta frente a agentes terapéuticos *in vivo*, se trataron ratones portadores de tumores subcutáneos dirigidos por EGFR con el inhibidor de EGFR, CI-1033 (Fig. 13). Después de 7 días de tratamiento con 20 mg/kg de CI-1033 administrado por vía intraperitoneal, el tamaño del tumor se midió en los ratones (Fig. 13A) y un análisis de transferencia Western usando anticuerpo anti-fosfo-EGFR se utilizó para determinar el estado de fosforilación de EGFR en las MVs que circulaban en los ratones (Fig. 13B, con MVs procedentes de ratones portadores de tumores subcutáneos A431 que se muestran en la parte superior y MVs de ratones portadores de tumores U373vIII mostrados en la parte inferior). Tanto los tumores A431 como los U373vIII eran sensibles a una exposición a una dosificación diaria de CI-1033. Además, había una presencia disminuida de EGFR humano fosforilado en las MVs que circulaban en la sangre de ratones portadores de tumores subcutáneos dirigidos por EGFR y tratados con el inhibidor de EGFR, CI-1033, como se observó mediante un análisis Western. El grado de inhibición de EGFR era menor en el caso del receptor mutante EGFRvIII (U373vIII), en comparación con EGFR de tipo silvestre (células A431) y esto se refleja en efectos antitumorales distintos.

20 Nuestros resultados demuestran que el estado de fosforilación de los RTKs activos, asociados con MVs, que son oncogénicos, es sensible a una terapia dirigida sistémica, dirigida a estos receptores y que el estado de estas dianas oncogénicas se puede verificar usando un análisis de sangre basado en el aislamiento de MVs y el análisis de su contenido. Estos hallazgos indican que las MVs circulantes se pueden utilizar como biomarcadores para supervisar la respuesta frente a agentes terapéuticos dirigidos contra oncogenes *in vivo*.

REIVINDICACIONES

1. Un método para supervisar la progresión de un cáncer o la eficacia terapéutica de un tratamiento contra el cáncer en un sujeto, que comprende:

5 a) aislar microvesículas a partir de una primera muestra de fluido corporal que se ha recogido a partir de un sujeto que tiene cáncer en un primer punto de tiempo y supervisar el estado de uno o varios sitios de fosforilación distintos de una proteína oncogénica o relacionada con el tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra de fluido corporal; y

10 b) aislar las microvesículas a partir de una segunda muestra de fluido corporal que se ha recogido a partir del sujeto que tiene cáncer en un segundo punto de tiempo, en donde el segundo punto de tiempo se produce después del primer punto de tiempo, y supervisar el estado de uno o varios sitios de fosforilación distintos de la proteína oncogénica o la proteína relacionada con el tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra de fluido corporal;

15 en donde un cambio en el estado de dicho uno o varios sitios de fosforilación distintos de la proteína oncogénica o relacionada con el tumor en las microvesículas obtenidas a partir de la segunda muestra de fluido corporal, en comparación con las microvesículas obtenidas a partir de la primera muestra de fluido corporal, indica progresión o regresión del cáncer, o indica una eficacia terapéutica o ineficacia del tratamiento contra el cáncer, cuando el primer punto de tiempo se produce antes de que el sujeto haya recibido un tratamiento contra el cáncer y el segundo punto de tiempo se produce después de que el sujeto haya recibido el tratamiento contra el cáncer; y en donde una regresión del cáncer o una eficacia terapéutica del tratamiento contra el cáncer se indica por un aumento de la forma no activa de la proteína oncogénica o relacionada con el tumor, y una progresión del cáncer o una ineficacia del tratamiento contra el cáncer se indica por un incremento en la forma activada de la proteína oncogénica o relacionada con el tumor, tal y como se determina por el estado de dicho uno o varios sitios de fosforilación distintos detectados en las microvesículas, en donde la proteína oncogénica o relacionada con el tumor es EGFR y el uno o varios sitios de fosforilación distintos se seleccionan a partir del grupo que consiste en T693, Y1110, Y1197, T678 e Y1068.

2. El método según la reivindicación 1, en el que al menos dos proteínas oncogénicas o relacionadas con el tumor se detectan en las microvesículas.

3. El método según la reivindicación 1, en el que la presencia de la proteína oncogénica o relacionada con el tumor en las microvesículas se detecta o se mide mediante inmunotransferencia, inmunoprecipitación, ELISA, RIA, citometría de flujo, microscopía electrónica o espectrometría de masas.

4. El método según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste en cáncer de mama, glioma, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer hematológico, cáncer de hueso, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, sarcoma uterino, cáncer de ovario, cáncer rectal o colorrectal, cáncer anal, cáncer de colon, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma endometrial, cáncer cervical, cáncer de vulva, carcinoma de células escamosas, carcinoma vaginal, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer endocrino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer adrenal, tumor del tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, tumor del SNC, astrocitoma, glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, linfoma del SNC primario, tumor de la médula ósea, gliomas del nervio tronco cerebral, adenoma de la pituitaria, melanoma uveal, cáncer testicular, cáncer oral, cáncer faríngeo, neoplasias pediátricas, leucemia, neuroblastoma, retinoblastoma, glioma pediátrico, meduloblastoma, tumor de Wilms, osteosarcoma, teratoma, rhabdomioblastoma y sarcoma.

5. El método según la reivindicación 1, en el que el fluido corporal es sangre.

6. El método según la reivindicación 1, en el que el fluido corporal se selecciona a partir del grupo que consiste en sangre, linfa, orina, fluido cerebroespinal, ascitis, saliva, lavado, semen, secreciones glandulares, exudado y contenidos de quistes y heces.

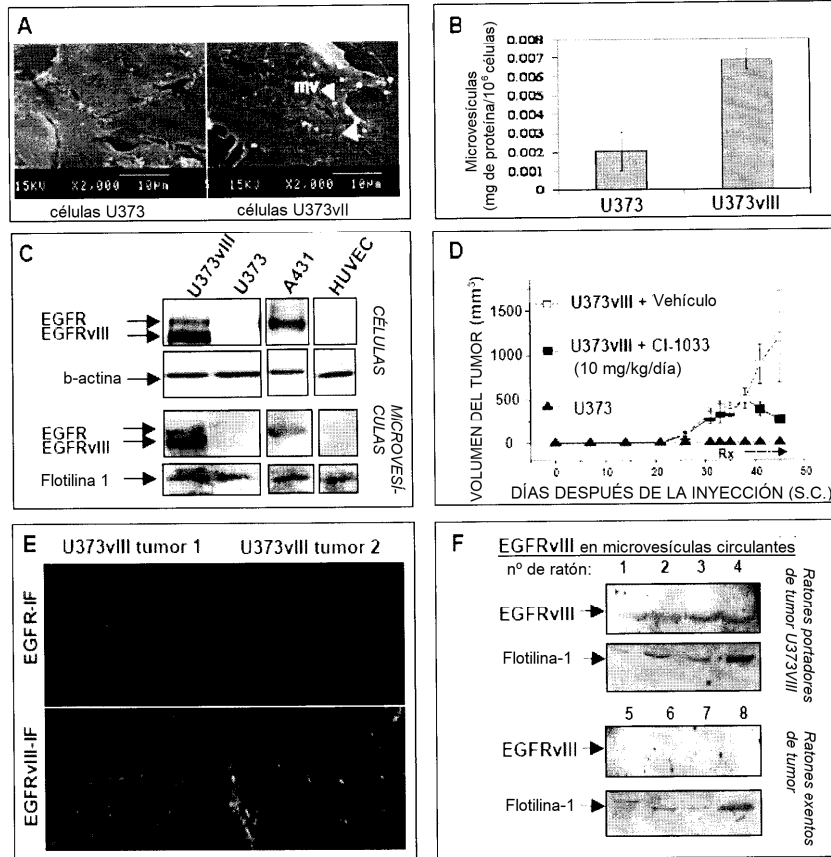


Fig. 1

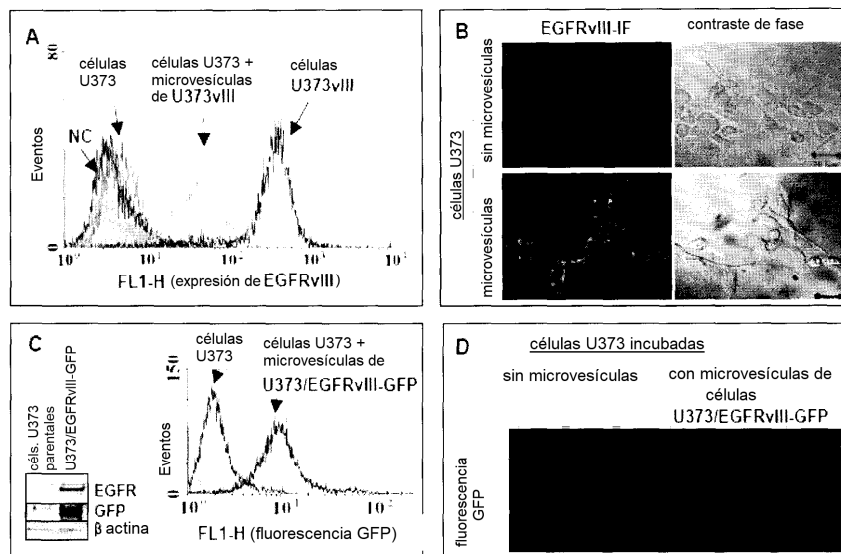


Fig. 2

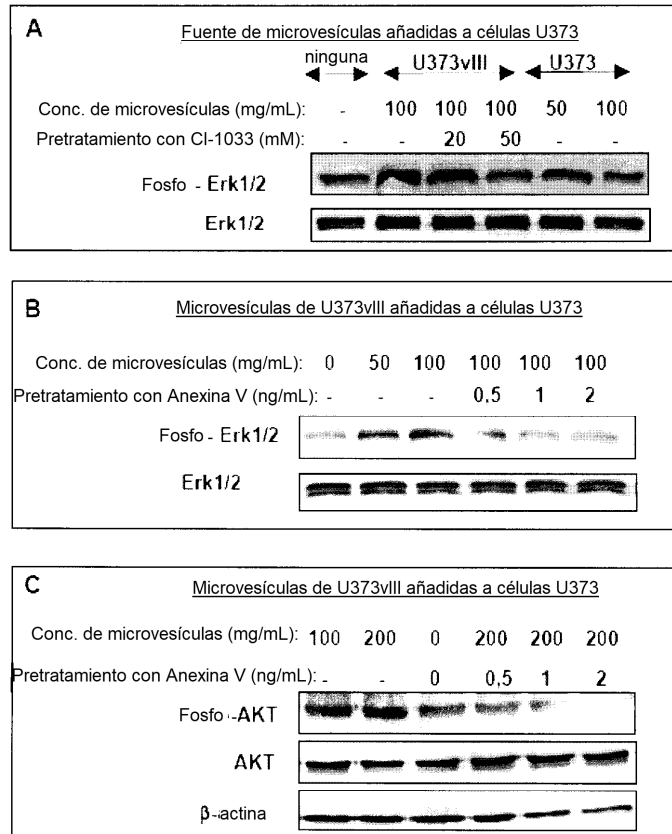


Fig. 3

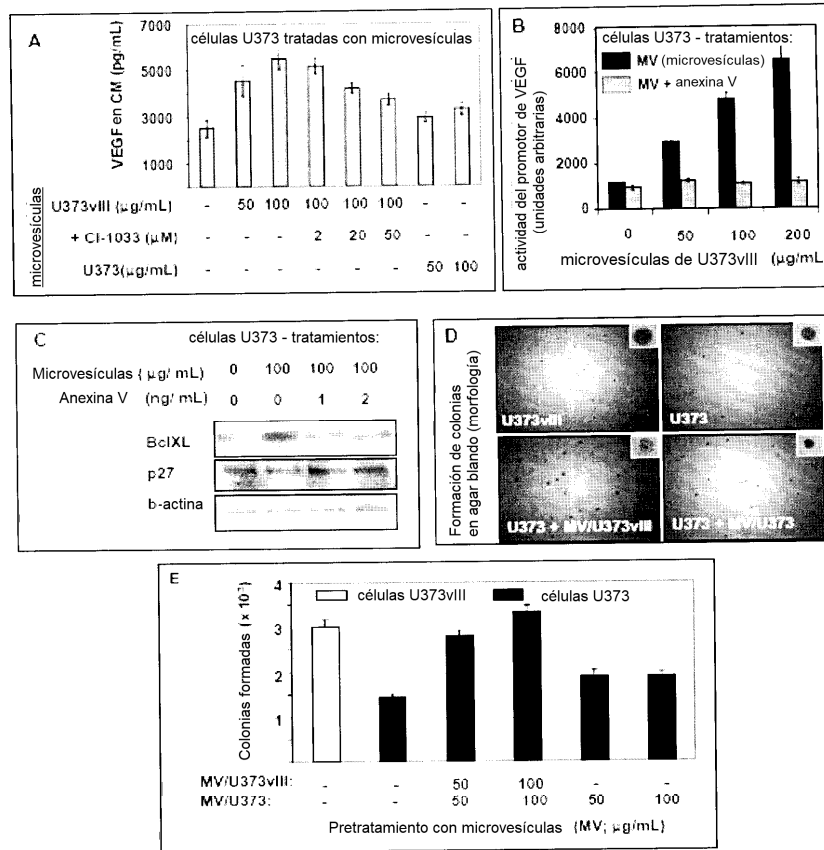


Fig. 4

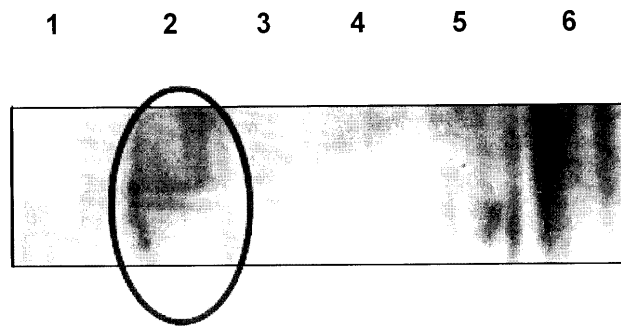


Fig. 5

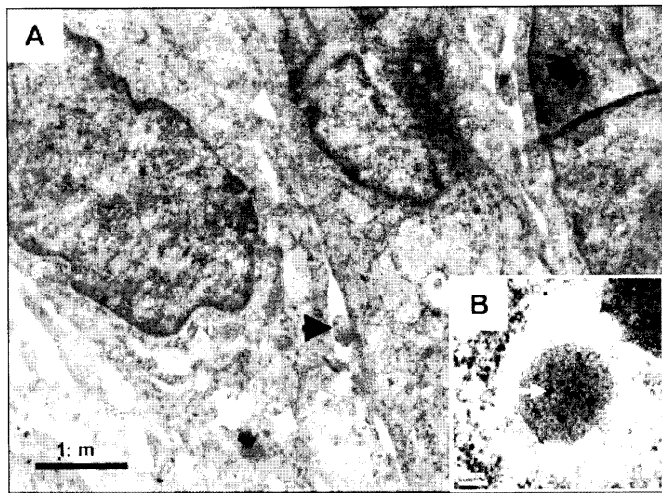


Fig. 6

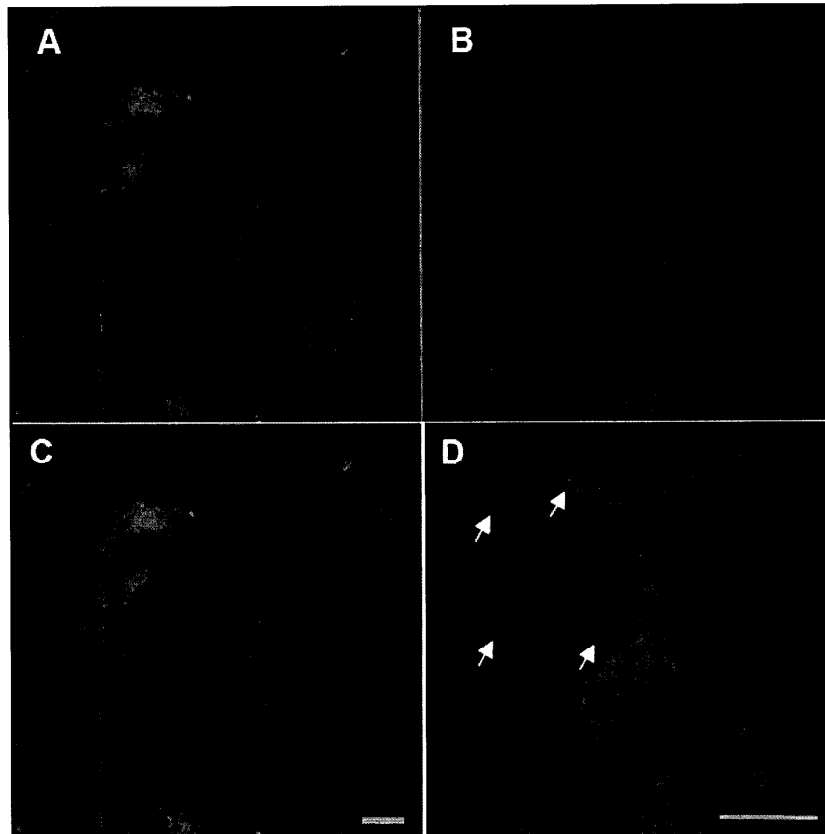


Fig. 7

n°	Sangre (MV _s)	Tum. (PCR)	Coh.	n°	Sangre (MV _s)	Tum. (PCR)	Coh.
1	+	+	TO	13	-	-	TO
2	+	+	TO	14	-	-	TO
3	+	+	TO	15	-	-	TO
4	+	-	TO	16	-	-	TO
5	-	-	TO	17	-	-	TO
6	-	-	TO	18	-	-	TO
7	-	-	TO	19	-	-	TO
8	-	-	TO	20	-	-	TO
9	-	-	TO	21	-	-	TO
10	-	-	TO	22	-	-	TO
11	-	-	TO	23	-	-	TO
12	-	-	TO	24	-	-	TO

Fig. 8

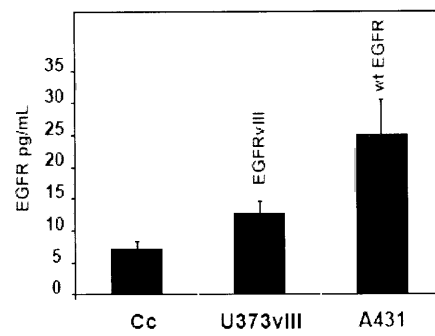


Fig. 9

	Anticuerpo →	Pan-Ras	K-ras	c-Met	PDGFR	beta-catenina	E-cadherina	PTEN	TP53
Tipo de tumor	Línea celular								
Glioma	U373	+	+	+	-	+/-	+	-	-
Glioma	U373vIII	+	+	+	-	+	+	-	-
Glioma	U87	-	+	+	+	+	-	+/-	-
Glioma	U87vIII	+	+	+	+	+	+	-	-
Cán. de pulmón	A549	-	+	+/-	+	-	-	-	-
Cán. de mama	MDA-MB-231	-	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-
Cán. de próstata	PC-3	-	+	-	+	+	-	-	-
Cán. colorrectal	DLD-1	-	+	+	+	+	-	+	-
Cán. colorrectal	HCT116	-	+	+	-	-	-	-	-
Cán. colorrectal	CaCo2	-	+	+	+	+/-	-	+	-

Fig. 10A

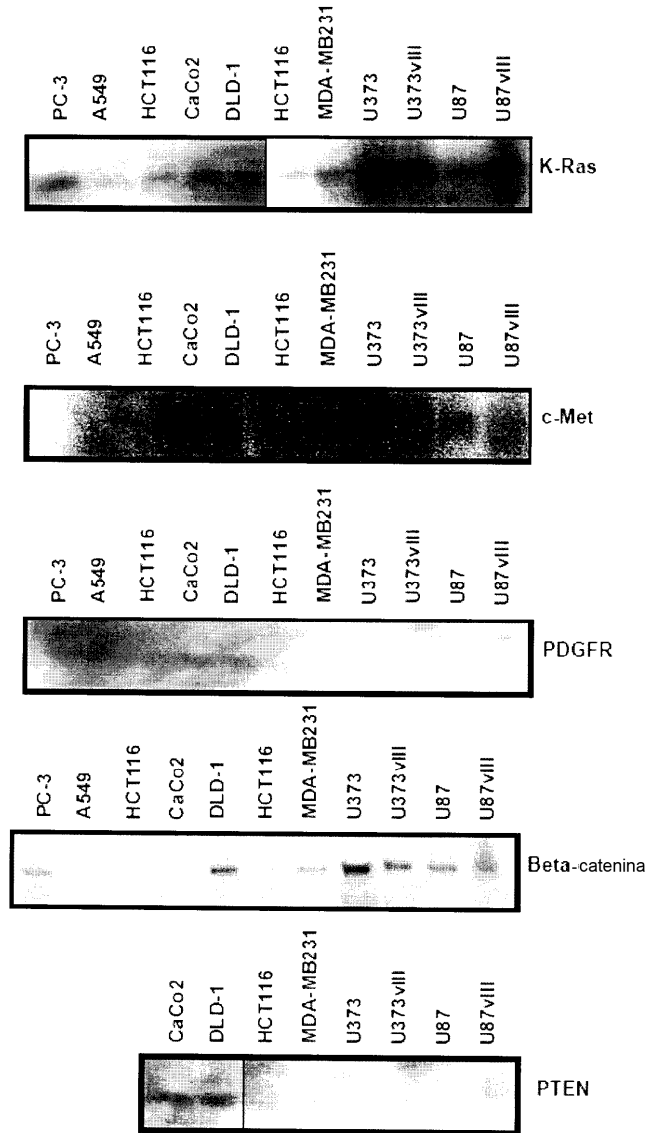


Fig. 10B

Axl	ErbB3	PDGF R alfa
Dtk	ErbB4	PDGF R beta
EGF R	FGF R1	c-Rel
EphA1	FGF R2 alfa	ROR1
EphA2	FGF R3	ROR2
EphA3	FGF R4	Src R
EphA4	Flt3	Tie-1
EphA6	HGF R	Tie-2
EphA7	IGF-1 R	TrkA
EphB1	Insulin R	TrkB
EphB2	IL-3R	TrkC
EphB4	Mec	VEGF R1
EphB5	MMP R	VEGF R2
ErbB2	MusK	VEGF R3

Fig. 11A

Tipo de tumor	Línea celular	P-RTKs principales detectados en MVs:
Glioma	U373	EGFR, ROR1, EphB2
Glioma	U373vIII	EGFR, ROR1, EphB2,
Glioma	U87	EGFR, ROR1, EphB2, FGFR3
Glioma	U87vIII	EGFR, ROR1, EphB2, FGFR3
Cán. de pulmón	A549	EGFR, ROR1, EphB2
Cán. de mama	MDA-MB-231	EGFR, ROR1, EphB2
Cán. de próstata	PC-3	EGFR, ROR1, EphB2
Cán. colorrectal	DLD-1	EGFR, ROR1, EphB2, FGFR3
Cán. colorrectal	HCT116	EGFR, ROR1, EphB2
Cán. colorrectal	CaCo2	EGFR, ROR1, EphB2

Fig. 11B

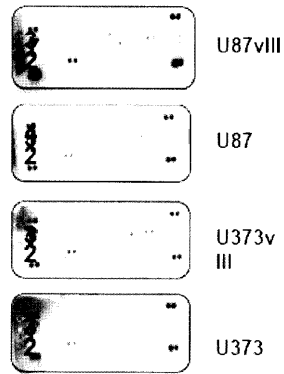


Fig. 11C

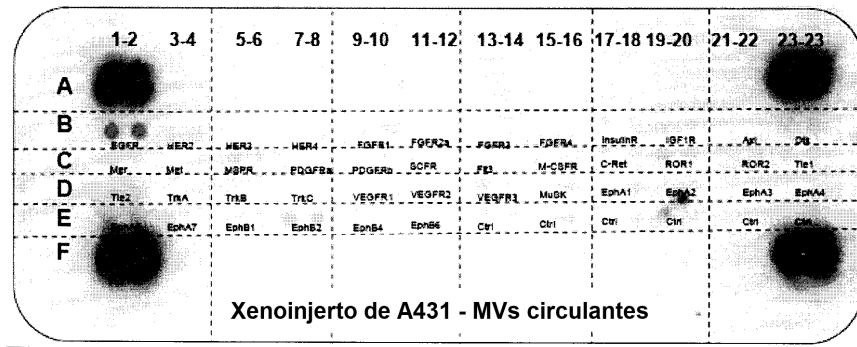


Fig. 12

Fig. 13A

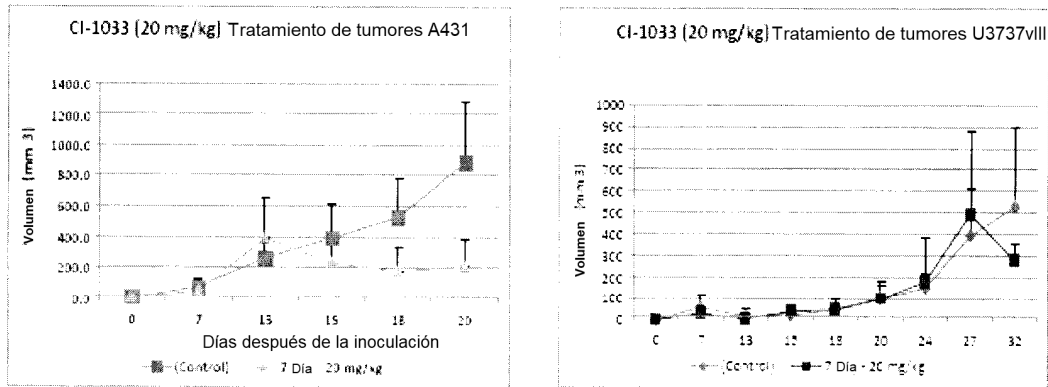


Fig. 13B

