

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 673**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2012** **E 15153870 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2019** **EP 2908132**

54 Título: **Predicción de la sensibilidad farmacológica de tumores de pulmón basándose en identificaciones moleculares y genéticas**

30 Prioridad:

02.03.2011 US 201161448479 P

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

11.12.2019

73 Titular/es:

SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)
Entre-deux-Villes
1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

GONG, HUA y
SHARAT, SINGH

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 734 673 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

Predicción de la sensibilidad farmacológica de tumores de pulmón basándose en identificaciones moleculares y genéticas

Referencia cruzada a solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/448.479, presentada el 2 de marzo de 2011.

Antecedentes de la invención

El cáncer de pulmón es la principal causa de muertes relacionadas con el cáncer en todo el mundo, dando como resultado 1,35 millones de casos nuevos y 1,8 millones de muertes al año según la estimación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2009 (Hoja Informativa de la Organización Mundial de la Salud N.º 297 de febrero de 2009; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>). El cáncer de pulmón generalmente se clasifica histológicamente en dos tipos principales, cáncer de pulmón microcítico (CPM) y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Aproximadamente el 85-90 % de los cánceres de pulmón son CPNM que representan tres subtipos principales basándose en el tamaño, forma y composición de las células tumorales, representando el adenocarcinoma el 40 %, el carcinoma de pulmón de células escamosas, el 25-30 % y representando el carcinoma de pulmón de células grandes el 10-15 % de todos los cánceres de pulmón (Vaporciyan *et al.*, Holland-Frei Cancer Medicine, 5ª edición, BC Decker, págs. 1227-1292 (2000); Roggli *et al.*, Hum Pathol., Jun; 16 (6): 569-79 (1985)).

Aunque no es óptimo, el tratamiento convencional actual para el cáncer de pulmón consiste en cirugía para candidatos operativos y quimioterapia para pacientes con enfermedad avanzada, siendo la supervivencia media para los pacientes con cáncer de pulmón más avanzado menor de un año (Schiller *et al.*, N Engl J Med. 10 de enero; 346(2):92-8 (2002)). En la última década, se ha logrado un progreso considerable en el tratamiento del CPNM debido a la aparición de nuevas terapias dirigidas específicas para las rutas de tirosina quinasa oncogénicas activadas en células tumorales. Por ejemplo, dos inhibidores de tirosina quinasa (TKI) del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), Gefitinib (Iressa) y Erlotinib (Tarceva) han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del CPNM localmente avanzado o metastásico que ha fracasado en al menos un régimen de quimioterapia previo (Comis RL, The Oncologist, Ago; 20(7):467-70, 2005; Ramalingam S., Sandler AB, The Oncologist, Jun; 11(6):655-65 (2006)). Otros inhibidores de la ruta de tirosina quinasa (RTK), tales como Sunitinib (Sutent), que se dirige a los receptores del factor de crecimiento derivados de plaquetas y receptores del factor de crecimiento endotelial vascular, así como crizotinib, un inhibidor de RTK del factor de crecimiento de hepatocitos, se encuentran en ensayos clínicos avanzados para CPNM (Papaetis GS, Syrigos KN, BioDrugs., Dic; 23(6):377-89 (2009); Neal JW, Sequist LV, Curr Treat Options Oncol., Jun; 11(1-2):36-44 (2010)).

Los avances logrados en la terapia dirigida para CPNM se basan en la comprensión del mecanismo por el que los genes mutados confieren un fenotipo neoplásico en células tumorales y cómo la interrupción dirigida de estas rutas oncogénicas conduce a respuesta clínica. Por tanto, el análisis de un panel de biomarcadores centrado en la ruta en muestras de tejido tumoral nuevas recogidas de pacientes podría allanar el camino para determinar si los marcadores están asociados con la terapia clínica óptima y pueden proporcionar un valor predictivo para identificar a los pacientes que responden. Además, las combinaciones de fármacos dirigidas contra los receptores que afectan a las moléculas de señalización corriente abajo pueden superar la activación de la ruta y la resistencia a fármacos vistas con frecuencia en la terapia de CPNM. Yauch *et al* indican que el fenotipo epitelial frente al mesenquimático determina la sensibilidad *in vitro* y predice la actividad clínica de erlotinib en pacientes con cáncer de pulmón (Clinical Cancer Research, vol. 11, n.º 24, parte 1, 2005, páginas 8686-8698). Mukohara *et al* indican efectos diferenciales de gefitinib y cetuximab en cánceres de pulmón no microcíticos que portan mutaciones en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Journal of The National Cancer Institute, vol. 97, n.º 16, 2005, páginas 1185-1194). Machida *et al* indican la caracterización de señalización de fosforilación de tirosina en el cáncer de pulmón usando el perfil de SH2 (PLoS ONE, vol. 5, n.º 10, 1, 2010, página e13470). Amann *et al* indican señalización aberrante del receptor del factor de crecimiento epidérmico y mayor sensibilidad a inhibidores de EGFR en el cáncer de pulmón (Cancer Research, vol. 65, n.º 1, 2005, páginas 226-235). Sin embargo, las dificultades para predecir la eficacia en terapia dirigida se deben al conocimiento limitado de las rutas oncogénicas activadas en el tumor de un paciente, por lo que no se recetan el o los inhibidores apropiados. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona también otras ventajas.

Breve resumen de la invención

La presente divulgación proporciona métodos para predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a uno o una combinación de medicamentos antineoplásicos en un sujeto que tiene un cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). En particular, los métodos de la presente divulgación comprenden analizar una muestra tal como una muestra de tejido tumoral obtenida de un sujeto que tiene cáncer de pulmón para determinar la presencia, el nivel de expresión, el nivel de activación y/o el genotipo de uno o más marcadores para obtener un perfil de marcadores y comparar el perfil de marcadores con los perfiles de marcadores conocidos obtenidos de una o más líneas celulares de cáncer de pulmón, tales como una biblioteca de líneas celulares, para predecir de este modo la

eficacia terapéutica o respuesta a uno o una combinación de fármacos antineoplásicos. En consecuencia, la presente divulgación es particularmente útil para predecir la eficacia terapéutica o respuesta a uno o más fármacos antineoplásicos analizando uno o un panel de biomarcadores de la ruta de transducción de señales y/o genes mutados en tejido tumoral obtenido de un sujeto con cáncer de pulmón para guiar las opciones de tratamiento para el sujeto basándose en similitudes en los perfiles de marcadores obtenidos del tejido tumoral y líneas celulares de cáncer de pulmón y la sensibilidad al fármaco de esas líneas celulares de cáncer de pulmón.

Como se describe en el presente documento, la activación de la ruta de tirosina quinasa receptora y mutaciones genéticas tanto en líneas celulares tumorales de pulmón humano como en líneas tisulares tumorales de pulmón humano se perfilaron para definir rutas moleculares que son útiles para evaluar la eficacia de terapias dirigidas. Se usó un panel de inhibidores de quinasa para determinar si la activación de la ruta de bloqueo afectó el crecimiento independiente y dependiente del anclaje de las líneas celulares tumorales. El agrupamiento jerárquico de muestras de tumores primarios con las líneas celulares tumorales correspondientes basándose en sus identificaciones de rutas reveló opciones de tratamiento potenciales para los tumores primarios basadas en la respuesta de línea celular tumoral al panel de inhibidores de quinasa. Los subconjuntos de tumores se identificaron como candidatos para el tratamiento con inhibidores de EGFR, c-Met, IGF-1R, MEK y PI3K. Se descubrió que la ruta de EGFR en líneas celulares mutantes de EGFR HCC827 y H1975 está altamente activada y es sensible a inhibidores que bloquean la señalización de EGFR. H1993 es una línea celular amplificada de c-Met que muestra la activación de la ruta de c-Met y EGFR y sensibilidad al tratamiento con inhibidores de c-Met. Las células H358 y A549 activadas por la ruta de IGF-1R son sensibles a la inhibición de IGF-1R. El inhibidor de PI3K corriente abajo, BEZ-235, inhibió eficazmente el crecimiento de células tumorales en la mayoría de las líneas celulares ensayadas, excepto las células H1993 y H1650, mientras que el inhibidor de MEK PD-325901 fue eficaz en el bloqueo del crecimiento de la línea celular mutada KRAS H1734, pero no las otras líneas celulares mutadas KRAS, H358, A549 y H460. Se identificaron tumores primarios con perfiles similares para EGFR, c-Met y activación de la ruta de IGF-1R y se predijo que esos pacientes serían candidatos para el tratamiento con inhibidores de quinasa individuales o combinaciones de ellos específicos. Por tanto, la presente divulgación combina la respuesta de línea celular de cáncer de pulmón a inhibidores de tirosina quinasa, información del biomarcador de la vía y/o estado mutacional y la identificación de rutas similares dentro de subconjuntos de muestras de tumores primarios, para fundamentar las opciones de tratamiento futuras apropiadas para pacientes con cáncer de pulmón.

En determinados aspectos, la presente invención proporciona un método para predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico en un sujeto que tiene cáncer de pulmón, comprendiendo dicho método:

- (a) determinar el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa que se ha aislado de dicho sujeto;
- (b) comparar el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en el extracto celular con un nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en cada una de las siguientes líneas celulares de cáncer de pulmón: HCC827, H1975, H1734, H1993, H358, H1650, A549 y H460; en donde se ha determinado que cada fármaco antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de HER1, un inhibidor de HER1/2, un inhibidor de HER1/2/4, un inhibidor de c-Met, un inhibidor de IGF-1R, un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K y una combinación de los mismos produce o no produce una respuesta en cada una de las líneas celulares de cáncer de pulmón;
- (c) identificar similitudes entre el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en el extracto celular y en las líneas celulares de cáncer de pulmón; y
- (d) predecir que el cáncer de pulmón del sujeto responderá al mismo fármaco antineoplásico o combinación de los mismos que produce una respuesta en una línea celular de cáncer de pulmón de la etapa (b) basándose en similitudes entre el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en el extracto celular y el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en la línea celular de cáncer de pulmón.

En algunos casos, el extracto celular se analiza adicionalmente o como alternativa para determinar el genotipo de uno o más (por ejemplo, una pluralidad de) marcadores tales como KRAS, P53 y/o STK11. En determinadas realizaciones, el extracto celular se produce a partir de una célula cancerosa que se ha aislado de una muestra tisular de tumor de pulmón primario, tal como, por ejemplo, una muestra de adenocarcinoma de pulmón.

Los fármacos antineoplásicos incluyen inhibidores de RTK específicos, así como múltiples, por ejemplo, inhibidores de HER1/2/4 (receptores del factor de crecimiento epidérmico) (por ejemplo, erlotinib para HER1, lapatinib para HER1/2, gefitinib para HER1/2/4 y BIBW-2992, un inhibidor irreversible para HER1/2); inhibidor de c-Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), PF-2341066; inhibidor de IGF-1R (receptor del factor de crecimiento de tipo insulina 1) BMS-536924; inhibidor de MEK (proteína quinasa quinasa activada por mitógeno), PD-325901; y el inhibidor de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) y mTOR (diana de mamífero de la rapamicina) BEZ-235. En determinados casos, se recomienda y/o selecciona una combinación de dos inhibidores de quinasa, por ejemplo, uno que inhibe la RTK apropiada y el otro que inhibe una ruta de señalización corriente abajo (o una combinación de dos inhibidores de quinasa corriente abajo).

Los niveles de fosforilación se pueden determinar utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas. En determinadas realizaciones, el nivel de fosforilación se detecta con un inmunoensayo tal como un único ensayo de

detección o un ensayo de detección doble de proximidad (por ejemplo, un ensayo de reacción potenciada de enzimas colaborativas (CEER™)) como se describe en el presente documento.

La tecnología de inmunoensayo reactivo potenciado de enzimas colaborativas (CEER™) se describe en los siguientes documentos de patente: publicaciones de PCT n.º WO 2008/036802, WO 2009/012140, WO 2009/108637, WO 2010/132723, WO 2011/008990 y WO 2011/050069; solicitud de PCT n.º PCT/US2011/066624.

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

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Perfil de las rutas de señalización de RTK activadas (p-Tyr) en las líneas celulares tumorales de pulmón. (A) Imágenes de portaobjetos del ensayo CEER™ obtenidas de las ocho líneas celulares tumorales. (B) Representación gráfica de las rutas de RTK activadas (p-Tyr) en las líneas celulares tumorales de pulmón perfiladas por el ensayo CEER™. Las células se cultivaron en presencia de FBS al 10 % en su medio respectivo hasta una confluencia del 80 % y se prepararon lisados celulares en tampón de lisis. La señal de activación se determinó a partir del lisado recogido. En cada línea celular, las rutas activadas se muestran en URF (unidades relativas de fluorescencia) basándose en el lisado obtenido a partir del número de células que se ensayan.

Figura 2. Inhibición de la activación de la ruta de señalización en líneas celulares tumorales de pulmón por inhibidores de quinasa. Las células tumorales de pulmón se cultivaron en FBS al 10 % hasta alcanzar una confluencia de ~80 % y después las células se privaron de alimento en medio sin suero durante una noche, seguido de 4 horas de tratamiento con los inhibidores. Después se prepararon y utilizaron lisados celulares para la determinación de las señales de activación de ruta mediante el ensayo CEER™.

Figura 3. Inhibición del crecimiento de células de tumor de pulmón mediante inhibidores de quinasa. Se cultivaron células de tumor de pulmón en FBS al 5 % más concentraciones crecientes de los inhibidores indicados, que varían de 0,01-10 µM, durante 48 horas. Se realizó determinación de la proliferación celular con el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo.

Figura 4. Inhibición del crecimiento independiente de anclaje de líneas celulares tumorales de pulmón por inhibidores seleccionados. Cada línea celular seleccionada se trató con el inhibidor indicado a concentraciones de 0,1 µM y 1 µM durante dos semanas y la formación del tamaño de las colonias celulares se evaluó bajo el microscopio de fase invertida Nikon.

Figura 5. Inhibición del crecimiento de células de tumor de pulmón mediante una combinación de dos inhibidores de quinasa. Se cultivaron líneas celulares tumorales de pulmón en FBS al 5 % más concentraciones crecientes del inhibidor de quinasa individual indicado o una combinación de los dos inhibidores de quinasa indicados. Se realizó determinación de la proliferación celular con el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo.

Figura 6. (A) Mapa de calor que representa las rutas de señalización activadas halladas en las 50 líneas tisulares tumorales de pulmón y ocho líneas celulares tumorales de pulmón. Cada fila constituye todos los marcadores de ruta determinados a partir de una muestra tumoral individual organizada en columnas. La leyenda indica marcadores que están presentes a niveles menores y mayores. (B) Agrupamiento de las 50 muestras de tumor de pulmón con las líneas celulares tumorales de pulmón correspondientes basándose en las similitudes en los marcadores entre las muestras tisulares y las líneas celulares.

Figura 7. Ilustración del principio de ensayo CEER™. El ensayo se basa en la formación de un inmunocomplejo que requiere la colocación de dos anticuerpos de detección contra la proteína diana capturada mostrada en negro.

Figura 8. Ilustración del protocolo de ensayo CEER™ para la determinación de las rutas de señalización activadas en líneas celulares tumorales de pulmón (panel izquierdo) y muestras tisulares y líneas celulares tumorales de pulmón (panel derecho).

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

Como se ilustra en el Ejemplo posterior, el agrupamiento de perfiles de marcadores obtenidos a partir de líneas tisulares tumorales de pulmón con perfiles de marcadores conocidos obtenidos de sus líneas celulares correspondientes proporciona información acerca de la terapia dirigida basada en los resultados del tratamiento con fármacos antineoplásicos obtenidos de las líneas celulares tumorales. Notablemente, el perfil de rutas de muestras recogidas de pacientes con cáncer de pulmón mostró similitudes en los marcadores entre líneas tisulares tumorales de pulmón y líneas celulares tumorales. En consecuencia, el perfil de marcadores obtenido de una muestra de cáncer

de pulmón (por ejemplo, células cancerosas aisladas de tejido de tumor de pulmón) se compara con perfiles de marcadores conocidos obtenidos de una o más líneas celulares de cáncer de pulmón, y similitudes en el nivel de expresión, el nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) y/o el genotipo del mismo marcador o los mismos marcadores tanto en la muestra de tejido tumoral como en la línea celular de cáncer de pulmón indican que se predice que el tumor de pulmón responderá al mismo fármaco antineoplásico o combinaciones de los mismos que inhiban la proliferación de la línea celular de cáncer de pulmón. Como tal, la presente divulgación encuentra utilidad en la predicción de la eficacia terapéutica o la respuesta a uno o un cóctel de fármacos antineoplásicos analizando uno o un panel de biomarcadores de ruta y/o genes mutados para diferenciar y agrupar diferentes líneas tisulares tumorales de pulmón con las líneas celulares tumorales correspondientes para guiar las opciones de tratamiento para el sujeto que tiene cáncer de pulmón basándose en la sensibilidad a fármacos de las líneas celulares tumorales.

II. Definiciones

Como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen el significado que se les asigna a menos que se especifique otra cosa.

Se pretende que el término "cáncer" incluya cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas conocidos, ya sean caracterizados como malignos, benignos, de tejidos blandos o sólidos, y cánceres de todos los estadios y grados, incluyendo cánceres pre y postmetastásicos. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico); cánceres digestivos y gastrointestinales tales como cáncer colorrectal, tumores estomacales gastrointestinales, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de ano, cáncer del conducto biliar, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago (gástrico); cáncer de esófago; cáncer de vesícula biliar; cáncer de hígado; cáncer de páncreas; cáncer de apéndice; cáncer de mama; cáncer de ovario; cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales); cáncer del sistema nervioso central; cáncer de piel; linfomas; coriocarcinomas; cánceres de cabeza y cuello; sarcomas osteógenos; y cánceres de sangre. Como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas. En una realización preferida, el tumor de pulmón procede de un sujeto con un cáncer de pulmón no microcítico tal como, por ejemplo, un carcinoma de células escamosas, un adenocarcinoma, un carcinoma macrocítico, carcinoma broncoalveolar (BAC) o carcinoma de células en grano de avena.

El término "analito" o "marcador" como se usa en el presente documento incluye cualquier molécula de interés, normalmente una macromolécula tal como un polipéptido o polinucleótido, cuya presencia, cantidad (nivel de expresión), estado o nivel de activación, genotipo (por ejemplo, estado de mutación) y/o identidad se determina. En determinados casos, el analito o marcador es una molécula de transducción de señales. En determinados casos, el analito o marcador es un gen, tal como un oncogén o un gen supresor tumoral.

La expresión "molécula de transducción de señales" o "transductor de señales" incluye proteínas y otras moléculas que llevan a cabo el proceso mediante el cual una célula convierte una señal o estímulo extracelular en una respuesta, que implica normalmente secuencias ordenadas de reacciones bioquímicas dentro de la célula. Los ejemplos de moléculas de transducción de señales incluyen, pero sin limitación, tirosina quinasas receptoras tales como EGFR (por ejemplo, EGFR/HER1/ErbB1, HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4), VEGFR1/FLT1, VEGFR2/FLK1/KDR, VEGFR3/FLT4, FLT3/FLK2, PDGFR (por ejemplo, PDGFRA, PDGFRB), c-KIT/SCFR, INSR (receptor de insulina), IGF-IR, IGF-IIR, IRR (receptor relacionado con el receptor de insulina), CSF-1R, FGFR 1-4, HGFR 1-2, CCK4, TRK A-C, c-MET, RON, EPHA 1-8, EPHB 1-6, AXL, MER, TYRO3, TIE 1-2, TEK, RYK, DDR 1-2, RET, c-ROS, V-cadherina, LTK (tirosina quinasa leucocitaria), ALK (linfoma quinasa anaplásica), ROR 1-2, MUSK, AATYK 1-3 y RTK 106; formas truncadas de tirosina quinasas receptoras tales como receptores HER2 truncados con dominios extracelulares amino terminales ausentes (por ejemplo, p95ErbB2 (p95m), p110, p95c, p95n, etc.); dímeros de tirosina quinasas receptoras (por ejemplo, p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, etc.); tirosina quinasas no receptoras tales como BCR-ABL, Src, Frk, Btk, Csk, Abl, Zap70, Fes/Fps, Fak, Jak, Ack y LIMK; componentes de cascada de señalización de tirosina quinasa tales como AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, homólogo de fosfatasa y tensina (PTEN), SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, variante de corte y empalme de quinasa p70 S6 alfa I), proteína tirosina fosfatasas (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), RAF, PLA2, MEKK, JNKK, JNK, p38, Shc (p66), Ras (por ejemplo, K-Ras, N-Ras, H-Ras), Rho, Rac1, Cdc42, PLC, PKC, p53, ciclina D1, STAT1, STAT3, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), mTOR, BAD, p21, p27, ROCK, IP3, TSP-1, NOS, GSK-3 β , RSK 1-3, JNK, c-Jun, Rb, CREB, Ki67 y paxilina; receptores de hormonas nucleares tales como receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de andrógenos, receptor de glucocorticoides, receptor de mineralocorticoides, receptor de vitamina A, receptor de vitamina D, receptor de retinoides, receptor de hormona tiroidea y receptores huérfanos; coactivadores y represores de receptores nucleares tales como amplificado en cáncer de mama-1 (AIB1) y correpresor de receptor nuclear 1 (NCOR), respectivamente; y combinaciones de los mismos.

La expresión "componente de una ruta de señalización de HER2" incluye uno cualquiera o más de un ligando corriente arriba de HER2, compañero de unión de HER2 y/o molécula efectora corriente abajo que se modula a través de HER2. Los ejemplos de componentes de la ruta de señalización de HER2 incluyen, pero sin limitación, heregulina,

HER1/ErbB1, HER2/ ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4, AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, PTEN, SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, variante de corte y empalme alfa I), proteína tirosina fosfatasa (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), dímeros de HER2 (por ejemplo, p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, etc.), GSK-3 β , PIP2, PIP3, p27 y combinaciones de los mismos.

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

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

El término "oncogén" incluye un gen que tiene el potencial de provocar cáncer. Los ejemplos no limitantes de oncogenes incluyen factores de crecimiento o mitógenos tales como c-Sis; tirosina quinasas receptoras tales como EGFR, HER2, PDGFR y VEGFR; tirosina quinasas citoplásmicas tales como Abl y quinasas en la familia Src, la familia Syk-ZAP-70 y la familia BTK de tirosina quinasas; serina/treonina quinasas citoplásmicas y sus subunidades reguladoras tales como PIK3CA, PIK3R1 y RAF (por ejemplo, RAF-1, A-RAF, B-RAF); GTPasas reguladoras tales como RAS (por ejemplo, KRAS); factores de transcripción tales como MYC; y combinaciones de los mismos.

La expresión "gen supresor tumoral" incluye un gen que tiene el potencial de proteger a una célula para que no se convierta en una célula cancerosa. Los ejemplos no limitantes de genes supresores tumorales incluyen el gen TP53 (también conocido como el gen P53), que codifica p53 (también conocida como proteína 53 o proteína tumoral 53); quinasas tales como, por ejemplo, tirosina quinasas o serina/treonina quinasas incluyendo serina/treonina quinasa 11 (STK11); el gen de RB1, que codifica la proteína de retinoblastoma (pRb); PTEN; VHL; APC; CD95; ST5; YPEL3; ST7; ST14; y combinaciones de los mismos.

La expresión "mutación de KRAS" incluye una cualquiera o más mutaciones en el gen KRAS (que también puede denominarse KRAS2 o RASK2). Los ejemplos de mutaciones de KRAS incluyen, pero sin limitación, G35A (G12D), G35T (G12V), G34T (G12C), G34A (G12S), G35C (G12A), G34C (G12R), G38A (G13D), G37T (G13C), C181A (Q61K), A183T (Q61H), A183C (Q61H), A182G (Q61R) y combinaciones de las mismas.

La expresión "mutación P53" incluye una cualquiera o más mutaciones en el gen P53 (que también puede denominarse TP53). Los ejemplos de mutaciones de P53 incluyen, pero sin limitación, C726G (C242W), G818T (R273L) y combinaciones de las mismas. Las mutaciones de P53 adicionales conocidas en la técnica dan como resultado variantes de proteínas incluyendo, pero sin limitación, Q5H, S6L, D7H, P8S, V10I, E11K/Q, S15R, Q16L, E17D, K24N, E28A, V31I, S33T, P34L, L35F, P36L, S37P/T, A39P/V, D42Y, L43S, M44I/T/V, L45M, S46F/P, P47L/S, D48G, D49H/N/Y, Q52H, W53C/G, F54L/Y, E56K/V, P58Q/T, G59C/D/N, P60L/Q/S, D61G/N, E62D, A63T/V, R65T, M66I/R, P67L/R/S, E68G/Q, A69D/G/T/V, A70T, P71T, P72C/G/H/I/R, V73E/I/M, A74T, P75L/R/S, A76G/T, P77A, A78V, A79G/T/V, P80L/S, T81I, P82L/S, A83E/V, A84G/V, P85L/S, A86V, P87Q, A88T/V/I, P89L/S, S90F/Y, W91C, P92A/I/S, L93M/P, S94L/T, S95F/T, S96C/F/P, V97A/F/I, P98L/S/F/P, Q100R, K101N/R, T102I, Q104H/I, G105C/D/R/S/V, S106G/R, Y107C/D/H, G108D/S, F109C/I/S, R110C/G/H/I/P/S, L111M/P/Q/R, g112D/S, F113C/G/I/I/S/V, H115Y, S116C/F/P, G117E/R, T118A/I/R, A118D/T, K120E/M/Q/R, S121F, V122L, T123I/N, C124G/R/S/W/Y,

T125A/K/M/P/R, Y126C/D/F/G/H/N/S, S127C/F/P/T/Y, P128A/I/R, A129D/G/T/V, L130F/H/I/P/R/V, N131D/H/I/K/S/T/Y, K132E/M/N/Q/R/T/W, M133I/K/I/R/T/V, F134C/I/I/I/S/V, C135F/G/R/S/T/W/Y, Q136E/H/K/P/R, L1137M/P/Q/V/A138D/P/S/T/V, K139E/N/Q/R/T, T140A/I/N/P/S, C141A/F/G/R/S/W/Y, Y P142A/F/H/I/R/S/T, V143A/E/G/I/M, Q144H/K/I/P/R, L145M/P/Q/R/V, W146C/G/I/R/S, V147A/D/E/F/G/I, D148A/E/G/N/V/Y, S149F/P/T, T150A/I/K/N/P/R, P151H/I/R/S/T, P152A/I/Q/R/S/T, P153A/F/H/I/R/S/T, G154A/C/D/I/S/V, T155A/I/M/N/P/S, R156R/C/G/H/I/P/S, V157A/D/F/G/I/I, R158C/F/G/H/K/P/W/S, R159D/F/G/P/S/T/V, M160I/K/T/V, A161D/F/G/P/S/T/V, I162F/M/N/S/T/V, Y163C/D/F/H/N/S, K164E/M/N/Q/R/T, Q165E/H/I/P/R, S166A/G/I/P, Q167H/K/I/R, H168D/I/N/P/Q/R/V/Y, M169I/K/T/V, T170A/K/M/P/S, E171A/D/G/K/Q/V, V172A/D/F/G/I, V173A/E/G/I/M/W, R174G/K/M/S/T/W, R175C/G/H/I/P/Q/S, C176 F/G/R/S/W/Y, P177A/F/H/I/I/R/S/T, H178D/I/N/P/Q/R/Y, H179L/N/P/Q/R/Y, E180A/D/G/K/Q/V, R181C/G/H/I/P/S, C182R/S/Y, S183Y/I/P, D184G/H/N/V/Y, S185G/I/N/R/T, D186E/G/H/N/V/Y, G187C/D/N/R/S/V, L188P/V, A189D/G/P/S/T/V, P190A/H/I/R/S/T, P191H/I/R/S/T, Q192H/K/I/P/R, H193D/I/N/P/Q/R/Y, L194F/H/I/P/R/V, I195F/I/N/S/T/V/Y, R196G/I/P/Q/S, V197E/G/I/M, E198D/G/K/Q/V, G199A/E/R/V, N200D/I/K/P/S/T, L201F/P/S, R202C/G/H/I/P/S, V203A/E/I/M/W, E204A/D/G/K/Q/V, Y205C/D/F/H/N/S, L206F/M, D207E/G/H/N/V/Y, D208E/G/H/I/N/V/Y, R209I/K/S/T, N210D/H/I/K/S/T/Y, T211A/I/N/P/S, F212I/I/S/V/Q, R213G/I/P/Q/W, H214D/P/Q/R/Y, S215C/G/I/K/N/R/T, V216A/E/G/I/M/W, V416W, V217A/E/G/I/I/M, V218A/E/G/I/M, P219C/H/I/R/S/T, Y220C/D/F/H/N/S, E221A/D/G/K/Q, P222A/I/Q/R/S/T, P223A/H/I/R/S/T, E224D/G/K/V, V225A/D/F/G/I/I, G226A/D/N/S/V, S227C/F/P/T, D228A/E/G/H/N/P/V/Y, C229G/N/R/S/Y, T230A/I/N/P/S, T231A/I/N/S, I232F/I/N/S/T/V, H233D/I/P/Q/R/Y, Y234C/D/F/H/K/N,Q/S, N235D/H/I/M/S/T/Y, Y236C/D/F/H/N/S, M237I/K/I/R/T/V, C238F/G/H/R/S/W/Y, N239D/H/I/K/S/T/Y, S240C/G/I/N/P/R/T, S241A/C/F/P/T/Y, C242F/G/R/S/W/Y, M243I/K/I/R/T/V, G244A/C/D/E/R/S/V, G245A/C/D/E/F/H/I/N/R/S/V, M246I/K/I/R/T/V, N247D/F/I/K/S/T/Y, R248C/G/I/P/Q/W, R249G/I/K/M/N/S/T/W, P250A/F/H/I/N/Q/S/T, I251F/I/M/N/S/T/V, L252F/H/I/P/V, T253A/I/N/P/S, I254D/F/I/M/N/S/T/V, I255F/M/N/S/T/V, T256K/P/S, L257P/Q/R/V, E258A/D/G/K/I/Q/V, D259A/E/G/H/N/P/S/V/Y, S260A/C/F/P/T/Y, S261C/G/I/N/R, G262C/D/H/S/V, N263D/H/I/K/S, L264I/P/Q/R/V, L265M/P/Q/R, G266A/E/R/V, R267G/H/P/Q/W, N268F/H/I/K/S/Y, S269C/G/I/N/R/T, F270C/I/I/S/V/Y, E271A/D/G/K/P/Q/R/V, V272A/E/G/I/M, R273C/G/H/I/N/P/Q/S/Y, C274A/D/F/G/I/I, C275F/G/R/S/W/Y, A276D/G/P/S/T/V, C277F/G/R/S/W/Y, P278A/F/H/I/R/S/T, G279E/R/V/W, R280K/P/S/T, D281A/E/G/H/N/R/V/Y, R282H/I/P/Q/W, R283C/G/H/I/P/S, T284A/I/K/P, E285A/D/G/K/Q/V, E286A/D/G/K/I/Q/V, E287A/D/G/K/V, N288K/S/T/Y, L289F/H/PR/V, R290C/H/I, K291E/M/N/Q/R/T, K292E/G/I/N/Q/R/T, G293A/R/V/W, E294A/D/G/K/Q/V, P295H/I/R/S, H296C/D/I/N/P/Q/R/Y, H297D/N/P/R/Q, E298A/D/K/Q/V, L299P/Q/R/V, P300A/I/R/S, P301A/I/Q/S/T, G302A/E/R/V, S303C/I/N/T, T304A/I/N/S, K305E/M/N/R/T, R306P/Q, A307P/S/T, L308M/V, P309R/S, N310I/T, N311H/K/S/T, T312I/S, S313C/I/N/R, S315C/F/P, P316L/T, Q317H/KL/P/R, P318L, L319E/N/R, K320N, K312E/R, P322L/R, L323G/M/P/R/V, D324E/S/Y, G325A/E/V, E326G, Y327H/S, F328L/S/V, T329I/S, L330H/P/R, Q331H/P/R, I332V, G334V/W, R335G/H/I, R337C/H/I/P, F338I/I, E339K/Q, F341C, R342L/P/Q, E343G, L344P/R, E346A, A3347G/T, L348F/S, E349D, D352H, A353T, Q354E/K/R, G356A/W, E358D/K, G360A/V, R363K, A364P/T/V, H365R/Y, S366A, K370Q, S376A/T, R379H, F385L, G389W, S392L, KM132-133ML, MA160-161P/IS/IT, QH167-168HD/YL, HM168-169LI, MT169-170IS, HH-179QS, QH192-193HN/HY, LR201-202FC, VE203-204LV, EE207-208EY, MG243-244IC/IS, NR247-248IP/KW, RP249-250SA/SS, GN262-263PD, DR281-282EW y combinaciones de las mismas.

La expresión "mutación STK11" incluye una cualquiera o más mutaciones en el gen STK11 (que también puede denominarse LKB1). Los ejemplos de mutaciones de STK11 incluyen, pero sin limitación, C109T (Q37Ter), G595T (E199Ter), C108A (Y36Ter), T145G (Y49D), G169T (E57Ter), T200C (L67P), A250T (K84Ter), G290+36T, G403C (G135R), G488A (G163D), C508T (Q170Ter), G580A (D194N), G580T (D194Y), A581T (D194V), G595A (E199K), G717C (W239C), C738G (Y246Ter), C759A (Y253Ter), C842T (P281L), G996A (W332Ter), C1062G (F354L), G169del (desplazamiento de marco E57K), TTGT787-790del (desplazamiento de marco L263F264), C842del (desplazamiento de marco P281R), una mutación en el dominio de quinasa y combinaciones de las mismas.

La expresión "mutación de BRAF" incluye una cualquiera o más mutaciones en el gen BRAF (que también puede denominarse serina/treonina-proteína quinasa B-Raf o B-Raf). Los ejemplos de mutaciones de BRAF incluyen, pero sin limitación, V600E, R461I, I462S, G463E, G463V, G465A, G465E, G465V, G468A, G468E, N580S, E585K, D593V, F594L, G595R, L596V, T598I, V599D, V599E, V599K, V599R, K600E, A727V y combinaciones de las mismas.

La expresión "mutación de PIK3CA" incluye una cualquiera o más mutaciones en el gen PIK3CA (que también puede denominarse PI3K o p110-alfa). Los ejemplos de mutaciones de PIK3CA incluyen, pero sin limitación, E545A, E545G, E545K, Q546E, Q546K, H1047R, H1047L, 3204insA y combinaciones de las mismas.

La expresión "mutación de EGFR" incluye una cualquiera o más mutaciones en el gen EGFR (que también puede denominarse HER1 o ErbB1). Los ejemplos de mutaciones de EGFR incluyen, pero sin limitación, supresiones en el exón 19 tales como L858R, G719S, G719C, L861Q y S768I, así como inserciones en el exón 20 tales como T790M y combinaciones de las mismas.

Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "serie de diluciones" incluya una serie de concentraciones descendentes de una muestra particular (por ejemplo, lisado celular) o reactivo (por ejemplo, anticuerpo). Se produce una serie de diluciones normalmente mediante un proceso de mezcla de una cantidad medida de una concentración de partida de una muestra o reactivo con un diluyente (por ejemplo, tampón de dilución) para crear una concentración menor de la muestra o reactivo y repetición del proceso suficientes veces para obtener el número deseado de diluciones en serie. La muestra o el reactivo se puede diluir en serie al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,

9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500 o 1000 veces para producir una serie de diluciones que comprende al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 concentraciones descendentes de la muestra o reactivo. Por ejemplo, una serie de diluciones que comprende una dilución en serie doble de un reactivo de anticuerpo de captura a una concentración de partida de 1 mg/ml puede producirse mezclando una cantidad de la concentración de partida de anticuerpo de captura con una cantidad igual de un tampón de dilución para crear una concentración de 0,5 mg/ml del anticuerpo de captura y repetir el proceso para obtener concentraciones de anticuerpos de captura de 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml, etc.

La expresión "rango dinámico superior", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un ensayo para detectar un analito específico en tan pocas como una célula o en tantas como miles de células. Por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento poseen un intervalo dinámico superior porque detectan provechosamente una molécula de transducción de señal particular de interés en aproximadamente 1-10.000 células (por ejemplo, aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500 o 10.000 células) utilizando una serie de diluciones de concentraciones de anticuerpos de captura.

El término "muestra" como se usa en el presente documento incluye cualquier muestra de ensayo biológica obtenida de un paciente. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre completa, plasma, suero, glóbulos rojos, glóbulos blancos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), líquido de lavado ductal, ascitis, descarga pleural, aspirado del pezón, linfa (por ejemplo, células tumorales diseminadas del ganglio linfático), aspirado de médula ósea, saliva, orina, deposición (es decir, heces), esputo, líquido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado de aguja fina (por ejemplo, recogido por aspiración de aguja fina periareolar aleatoria), cualquier otro líquido corporal, una muestra tisular (por ejemplo, tejido tumoral) tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo, biopsia de aguja) o un ganglio linfático (por ejemplo, biopsia de ganglio linfático centinela), una muestra tisular (por ejemplo, tejido tumoral) tal como una resección quirúrgica de un tumor y extractos celulares del mismo. En algunos aspectos, la muestra es sangre completa o un componente fraccional de la misma tal como plasma, suero o un sedimento celular. En otros aspectos, la muestra se obtiene aislando células en circulación de un tumor sólido de sangre completa o una fracción celular de la misma utilizando cualquier técnica conocida en este campo. En otros aspectos más, la muestra es una muestra tisular tumoral fijada en formalina incluida en parafina (FFPE), por ejemplo, de un tumor sólido tal como cáncer de pulmón. En aspectos particulares, la muestra es un lisado o extracto de tumor preparado a partir de tejido congelado obtenido de un sujeto que tiene cáncer de pulmón.

Una "biopsia" se refiere al proceso de retirada de una muestra tisular para evaluación de diagnóstico o pronóstico y a la propia muestra de ensayo tisular. Cualquier técnica de biopsia conocida en este campo puede aplicarse a los métodos y composiciones de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá en general del tipo de tejido que se evaluará y del tamaño y tipo del tumor (es decir, sólido o suspendido (es decir, sangre o ascitis)), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen biopsia por escisión, biopsia por incisión, biopsia por aguja (por ejemplo, biopsia por aguja gruesa, biopsia por aspiración con aguja fina, etc.), biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Se analizan técnicas de biopsia, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, *et al.*, eds., 16ª ed., 2005, Capítulo 70 y en toda la Parte V. Un experto en la materia apreciará que se pueden realizar técnicas de biopsia para identificar células cancerosas y/o precancerosas en una muestra tisular dada.

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

Una "matriz" o "micromatriz" comprende un conjunto definido y/o una serie de diluciones de anticuerpos de captura inmovilizados o restringidos sobre un soporte sólido tal como, por ejemplo, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, alfileres, filtros, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas de poliestireno, etc.), papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, difluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. Los anticuerpos de captura generalmente están inmovilizados o restringidos sobre el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En determinados casos, los anticuerpos de captura comprenden marcadores de captura que interactúan con agentes de captura unidos al soporte sólido. Las matrices utilizadas en los ensayos descritos en el presente documento comprenden normalmente una pluralidad de diferentes anticuerpos de captura y/o concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes localizaciones conocidas/direccionables.

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

La expresión "anticuerpo de detección" como se usa en el presente documento incluye un anticuerpo que comprende un marcador detectable que es específico para (es decir, se une, está unido con o forma un complejo con) uno o más

analitos de interés en una muestra. El término también abarca un anticuerpo que es específico para uno o más analitos de interés, en donde el anticuerpo puede estar unido con otra especie que comprende un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, marcadores de biotina/estreptavidina, marcadores de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido), marcadores químicamente reactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos y combinaciones de los mismos. Están disponibles anticuerpos de detección adecuados para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquiera de una diversidad de moléculas de transducción de señales de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Mineápolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO) y BD Biosciences (San Jose, CA). Como un ejemplo no limitante, están disponibles anticuerpos fosfoespecíficos contra diversas formas fosforiladas de moléculas de transducción de señales tales como EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, AKT, MAPK, PTEN, Raf y MEK de Santa Cruz Biotechnology.

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

La expresión "anticuerpo independiente del estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico para (es decir, se une, está unido con o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra, independientemente de su estado de activación. Por ejemplo, el anticuerpo independiente del estado de activación puede detectar formas tanto fosforiladas como desfosforiladas de uno o más analitos, tales como una o más moléculas de transducción de señales.

El término "incubación" se usa como sinónimo de "contacto" y "exposición" y no implica ningún requisito específico de tiempo o temperatura a menos que se indique otra cosa.

Las "tirosina quinasas receptoras" o "RTK" incluyen una familia de cincuenta y seis (56) proteínas caracterizadas por un dominio transmembrana y un motivo de tirosina quinasa. Las RTK actúan en la señalización celular y transmiten señales que regulan el crecimiento, la diferenciación, la adhesión, la migración y la apoptosis. La activación mutacional y/o sobreexpresión de tirosina quinasas receptoras transforman células y, con frecuencia, desempeñan un papel crucial en el desarrollo de cánceres. Las RTK se han convertido en dianas de diversos agentes de dirección molecular tales como trastuzumab, cetuximab, gefitinib, erlotinib, sunitinib, imatinib, nilotinib y similares. Una ruta de transducción de señal bien caracterizada es la ruta de MAP quinasa, que es responsable de la transducción de la señal del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a la promoción de la proliferación celular en células.

El término "gen" y variantes del mismo incluyen el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye regiones que preceden y siguen a la región codificante, tales como el promotor y la región 3' no traducida, respectivamente, así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

El término "genotipo" y variantes del mismo se refiere a la composición genética de un organismo, incluyendo, por ejemplo, si un organismo diploide es heterocigoto u homocigoto para uno o más alelos variantes de interés.

El término "polimorfismo" y variantes del mismo se refieren a la aparición de dos o más secuencias o alelos alternativos determinados genéticamente en una población. Un "sitio polimórfico" se refiere al locus en el que se produce divergencia. Los sitios polimórficos preferidos tienen al menos dos alelos, apareciendo cada uno en una frecuencia particular en una población. Un locus polimórfico puede ser tan pequeño como un par de bases (por ejemplo,

polimorfismo de un único nucleótido o SNP). Los marcadores polimórficos incluyen polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, número variable de repeticiones en tándem (VNTR), regiones hipervariables, minisatélites, repeticiones de dinucleótidos, repeticiones de trinucleótidos, repeticiones de tetranucleótidos, repeticiones de secuencia sencilla y elementos de inserción tales como Alu. El primer alelo identificado se designa arbitrariamente como el alelo de referencia y otros alelos se designan como alelos alternativos, "alelos variantes", o "variaciones". El alelo que aparece con mayor frecuencia en una población seleccionada se puede denominar en ocasiones alelo "de tipo silvestre". Los organismos diploides pueden ser homocigotos o heterocigotos para los alelos variantes. El alelo variante puede o no producir una característica física o bioquímica observable ("fenotipo") en un individuo portador del alelo variante. Por ejemplo, un alelo variante puede alterar la actividad enzimática de una proteína codificada por un gen de interés o, como alternativa, el alelo variante puede no tener ningún efecto sobre la actividad enzimática de una proteína codificada.

La expresión "polimorfismo de un único nucleótido (SNP)" y variantes de la misma se refiere a un cambio de un único nucleótido en un polinucleótido, incluyendo en un alelo. Esto puede incluir el reemplazo de un nucleótido por otro, así como supresión o inserción de un único nucleótido. Lo más normalmente, los SNP son marcadores bialélicos, aunque también pueden existir marcadores tri- y tetraalélicos. A modo de ejemplo no limitante, una molécula de ácido nucleico que comprende SNP A/C puede incluir una C o A en la posición polimórfica. Para combinaciones de SNP, se utiliza el término "haplotipo", por ejemplo, el genotipo de los SNP en una sola cadena de ADN que están ligados entre sí. En algunos aspectos, el término "haplotipo" se puede usar para describir una combinación de alelos de SNP, por ejemplo, los alelos de los SNP hallados juntos en una única molécula de ADN. En aspectos adicionales, los SNP en un haplotipo pueden estar en desequilibrio de enlace entre sí.

III. Descripción

La presente divulgación proporciona métodos para predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a uno o una combinación de medicamentos antineoplásicos en un sujeto que tiene un cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). En particular, los métodos de la presente divulgación comprenden analizar una muestra tal como una muestra de tejido tumoral obtenida de un sujeto que tiene cáncer de pulmón para determinar la presencia, el nivel de expresión, el nivel de activación y/o el genotipo de uno o más marcadores para obtener un perfil de marcadores y comparar el perfil de marcadores con los perfiles de marcadores conocidos obtenidos de una o más líneas celulares de cáncer de pulmón, tales como una biblioteca de líneas celulares, para predecir de este modo la eficacia terapéutica o respuesta a uno o una combinación de fármacos antineoplásicos. En consecuencia, la presente divulgación es particularmente útil para predecir la eficacia terapéutica o respuesta a uno o más fármacos antineoplásicos analizando uno o un panel de biomarcadores de la ruta de transducción de señales y/o genes mutados en tejido tumoral obtenido de un sujeto con cáncer de pulmón para guiar las opciones de tratamiento para el sujeto basándose en similitudes en los perfiles de marcadores obtenidos del tejido tumoral y líneas celulares de cáncer de pulmón y la sensibilidad al fármaco de esas líneas celulares de cáncer de pulmón.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un método para predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico en un sujeto que tiene cáncer de pulmón, comprendiendo el método:

(a) determinar el nivel de expresión y/o nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más marcadores en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada del sujeto para obtener un perfil de marcadores (por ejemplo, perfil de marcadores de ensayo);

(b) comparar el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) con perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) para una o más líneas celulares de cáncer de pulmón (por ejemplo, para identificar similitudes y/o diferencias entre el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más de los marcadores en los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia); y

(c) predecir la eficacia terapéutica o respuesta a un fármaco antineoplásico basándose en las similitudes entre el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) y uno o más de los perfiles de marcadores conocidos para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón.

En algunos aspectos de la divulgación, las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia corresponden a similitudes en el nivel de expresión y/o nivel de activación de uno o más de los marcadores entre el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) y los perfiles de marcadores conocidos para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón.

Se predice que el cáncer de pulmón responderá al mismo fármaco antineoplásico que produce una respuesta en una línea celular de cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar (por ejemplo, la línea celular de cáncer de pulmón muestra sensibilidad al fármaco antineoplásico). En determinados casos, se predice que el cáncer de pulmón responderá al mismo fármaco antineoplásico que suprime o inhibe el crecimiento (por ejemplo, proliferación) de una línea celular de cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al perfil de marcadores obtenido en la etapa (a). Como un ejemplo no limitante, la respuesta de la línea celular de cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar puede corresponder a la supresión o inhibición del crecimiento de la línea celular de cáncer de pulmón.

Los perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) comprenden una biblioteca de perfiles de marcadores conocidos, por ejemplo, una biblioteca de perfiles de marcadores conocidos para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón. Los perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) tienen fármacos terapéuticos conocidos asociados con sus eficacias.

La etapa de predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico se basa en un perfil terapéutico. En determinados casos, el perfil terapéutico comprende una colección o una biblioteca de fármacos terapéuticos conocidos (por ejemplo, antineoplásicos) asociados con la eficacia o respuesta en la o las líneas celulares de cáncer de pulmón.

En otros aspectos determinados, la presente divulgación proporciona un método para seleccionar un fármaco antineoplásico adecuado para el tratamiento de un cáncer de pulmón, comprendiendo el método:

(a) determinar el nivel de expresión y/o nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) de uno o más marcadores en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada de un sujeto para obtener un perfil de marcadores (por ejemplo, perfil de marcadores de ensayo);

(b) comparar el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) con perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) para una o más líneas celulares de cáncer de pulmón (por ejemplo, para identificar similitudes y/o diferencias entre el nivel de expresión y/o el nivel de activación de uno o más de los marcadores en los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia); y

(c) seleccionar un fármaco antineoplásico adecuado para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) y uno o más de los perfiles de marcadores conocidos para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón.

En otros aspectos de la divulgación, las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia corresponden a similitudes en el nivel de expresión y/o nivel de activación de uno o más de los marcadores entre el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) y los perfiles de marcadores conocidos para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón.

En otros aspectos determinados, el fármaco antineoplásico adecuado se selecciona como el mismo fármaco antineoplásico que produce una respuesta en una línea celular de cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar (por ejemplo, la línea celular de cáncer de pulmón muestra sensibilidad al fármaco antineoplásico). En determinados casos, el fármaco antineoplásico adecuado se selecciona como el mismo fármaco antineoplásico que suprime o inhibe el crecimiento (por ejemplo, proliferación) de una línea celular de cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al perfil de marcadores obtenido en la etapa (a). Como un ejemplo no limitante, la respuesta de la línea celular de cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar puede corresponder a la supresión o inhibición del crecimiento de la línea celular de cáncer de pulmón.

En algunos aspectos, los perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) comprenden una biblioteca de perfiles de marcadores conocidos, por ejemplo, una biblioteca de perfiles de marcadores conocidos para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón. En determinados casos, los perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) tienen fármacos terapéuticos conocidos asociados con sus eficacias.

En algunos aspectos, la etapa de seleccionar un fármaco antineoplásico adecuado se basa en un perfil terapéutico. En determinados casos, el perfil terapéutico comprende una colección o una biblioteca de fármacos terapéuticos conocidos (por ejemplo, antineoplásicos) asociados con la eficacia o respuesta en la o las líneas celulares de cáncer de pulmón.

En determinados aspectos, el nivel de expresión y/o nivel de activación del o los marcadores se calibran frente a una curva patrón generada para cada uno de estos marcadores.

En determinados aspectos, la célula cancerosa se aísla de una muestra de tejido tumoral tal como una muestra de tumor de pulmón primario. En casos particulares, un extracto celular se produce a partir de una célula cancerosa aislada de la muestra de tejido tumoral.

En algunos aspectos, la o las líneas celulares de cáncer de pulmón se seleccionan del grupo que consiste en líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) incluyendo HCC827, H1975, H1734, H1993, H358, H1650, A549, H460, HCC827-CR, HCC827-HGF, HCC827-GR, H292, VMRC-LCD y combinaciones de los mismos. En realizaciones particulares, la o las líneas celulares de cáncer de pulmón se seleccionan del grupo que consiste en HCC827, H1975, H1734, H1993, H358, H1650, A549, H460 y combinaciones de las mismas. El fármaco antineoplásico puede seleccionarse del grupo que consiste en inhibidores de HER1, inhibidores de HER1/2 y/o inhibidores de HER1/2/4 (por ejemplo, erlotinib para HER1, lapatinib para HER1/2, gefitinib para HER1/2/4 y BIBW-2992, un inhibidor irreversible para HER1/2); inhibidores de c-Met (por ejemplo, PF-2341066); inhibidores de IGF-1R (por ejemplo, BMS-536924); inhibidores de MEK (por ejemplo, PD-325901); inhibidores de PI3K y mTOR (por ejemplo, BEZ-235); y combinaciones de los mismos. A continuación se describen ejemplos adicionales de fármacos

antineoplásicos.

En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es HCC827 y el perfil de marcadores conocido para HCC827 comprende HER1 y HER2 muy activados (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de HER1/2 tales como BIBW-2992 o lapatinib, inhibidores de HER1/2/4 tales como gefitinib, inhibidores de HER1 tales como erlotinib o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón HCC827 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón HCC827. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que HCC827 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de HCC827.

En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es H1975 y el perfil de marcadores conocido para H1975 comprende un nivel elevado de HER1 y/o HER2 activados (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de HER1/2 tales como BIBW-2992, inhibidores de HER1 tales como erlotinib, inhibidores de IGF-1R tales como BMS-536924 o combinaciones de los mismos. En determinados casos, la línea celular de cáncer de pulmón H1975 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de HER1/2 tal como BIBW-2992 con un inhibidor de MEK tal como PD-325901 o un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En otros casos, la línea celular de cáncer de pulmón H1975 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de HER1 tal como erlotinib y un inhibidor de c-Met tal como SU11274. En algunas realizaciones, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H1975 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H1975. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que H1975 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H1975.

En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es H1734 y el perfil de marcadores conocido para H1734 comprende un nivel elevado de HER1 y/o HER2 activados (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de HER1/2 tales como lapatinib, inhibidores de HER1 tales como erlotinib, inhibidores de MEK tales como PD-325901, inhibidores de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMP cíclico (CREB), tales como Ro-31-8220, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H1734 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H1734. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que H1734 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H1734.

En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es H1993 y el perfil de marcadores conocido para H1993 comprende c-Met muy activado (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de c-Met tales como PF-2341066, inhibidores de MEK tales como PD-325901 o combinaciones de los mismos. En determinados casos, la línea celular de cáncer de pulmón H1993 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de c-Met tal como PF-2341066 con un inhibidor de MEK tal como PD-325901 o un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En otros casos determinados, la línea celular de cáncer de pulmón H1993 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de MEK tal como PD-325901 y un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En algunas realizaciones, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H1993 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H1993. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que H1993 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H1993.

En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es H358 y el perfil de marcadores conocido para H358 comprende un nivel elevado de HER1 y/o HER2 activados (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de HER1/2 tales como lapatinib, inhibidores de HER1 tales como erlotinib, inhibidores de HER1/2/4 tales como gefitinib, inhibidores de IGF-1R tales como BMS-536924 o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la línea celular de cáncer de pulmón H358 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de HER1 tal como erlotinib con un inhibidor de MEK tal como PD-325901 o un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En otras realizaciones, la línea celular de cáncer de pulmón H358 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de MEK tal como PD-325901 y un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En algunas realizaciones, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H358 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H358. Como tales, uno o más de los fármacos

antineoplásicos a los que H358 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H358.

5 En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es H1650 y el perfil de marcadores conocido para H1650 comprende un nivel elevado de HER1 y/o HER2 activados (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de HER1/2 tales como BIBW-2992, inhibidores de IGF-1R o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la línea celular de cáncer de pulmón H1650 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de HER1/2 tal como BIBW-2992 con un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En otras realizaciones, la línea celular de cáncer de pulmón H1650 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de MEK tal como PD-325901 y un inhibidor de PI3K tal como BEZ-235. En realizaciones adicionales, la línea celular de cáncer de pulmón H1650 es particularmente sensible a una combinación de un inhibidor de HER1/2 o inhibidor de HER1/2/4 tal como gefitinib y un inhibidor de IGF-1R. En algunas realizaciones, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H1650 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H1650. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que H1650 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H1650.

20 En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es A549 y el perfil de marcadores conocido para A549 comprende un nivel elevado de IGF-1R activado (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de IGF-1R tales como BMS-536924, inhibidores de MEK tales como PD-325901, inhibidores de PI3K tales como BEZ-235 o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la línea celular de cáncer de pulmón A549 es particularmente sensible a una combinación de un agente radioterapéutico tal como ¹³¹I-RC-160 y un antimetabolito tal como 5-fluorocitosina (5-FC). En algunos casos, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón A549 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón A549. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que A549 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de A549.

35 En una realización, la línea celular de cáncer de pulmón es H460 y el perfil de marcadores conocido para H460 comprende un nivel elevado de IGF-1R activado (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para inhibidores de IGF-1R tales como BMS-536924, inhibidores de PI3K tales como BEZ-235 o combinaciones de los mismos. En algunos casos, se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H460 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H460. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que H460 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H460.

45 También se desvela la línea celular de cáncer de pulmón HCC827-CR. El perfil de marcadores conocido para HCC827-CR comprende un nivel elevado de AKT activado (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para una combinación de un inhibidor de la actividad de la ruta de señalización de PI3K/AKT (por ejemplo, un inhibidor de PI3K) y un inhibidor de HER1/2/4 tal como gefitinib o un anticuerpo monoclonal tal como cetuximab. Se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón HCC827-CR (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón HCC827-CR. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que HCC827-CR muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de HCC827-CR.

55 También se desvela que la línea celular de cáncer de pulmón es HCC827-HGF o HCC827-GR. El perfil de marcadores conocido para estas líneas celulares comprende un nivel elevado de c-Met activado (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos para una combinación de un inhibidor de HER1/2/4 tal como gefitinib y un inhibidor de c-Met o un anticuerpo anti-HGF tal como TAK-701. Se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de una de estas líneas celulares de cáncer de pulmón (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que una de estas líneas celulares de cáncer de pulmón muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de HCC827-HGF o HCC827-GR.

65 También se desvela que la línea celular de cáncer de pulmón es H292. El perfil de marcadores conocido para H292 comprende un nivel elevado de HER1 activado (por ejemplo, altos niveles de activación) y sensibilidad a fármacos

para una combinación de un anticuerpo monoclonal anti-HER1 tal como cetuximab y un agente quimioterapéutico tal como docetaxel. Se predice que un cáncer de pulmón que tiene un perfil de marcadores similar al de la línea celular de cáncer de pulmón H292 (por ejemplo, que comparte un patrón similar de niveles de expresión y/o activación para los marcadores determinados) responderá al mismo fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos a los que responde la línea celular de cáncer de pulmón H292. Como tales, uno o más de los fármacos antineoplásicos a los que H292 muestra sensibilidad pueden seleccionarse para el tratamiento del cáncer de pulmón basándose en las similitudes entre los perfiles de marcadores de ensayo y de referencia de H292.

De acuerdo con la presente divulgación, el nivel de expresión y/o nivel de activación de uno o más marcadores se expresa como un valor de unidades relativas de fluorescencia (URF) que corresponde a la intensidad de señal para un analito particular de interés que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como el inmunoensayo reactivo potenciado de enzimas colaborativas (CEER) descrito en el presente documento. En otros aspectos de la divulgación, el nivel de expresión y/o nivel de activación del o los marcadores se expresa como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" que corresponde a intensidad de señal creciente para un analito particular de interés que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER. En algunos casos, un nivel de expresión o activación indetectable o mínimamente detectable de un analito de interés particular que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER, puede expresarse como "-" o "±". En otros casos, un nivel bajo de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER, puede expresarse como "+". En otros casos más, un nivel moderado de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER, puede expresarse como "++". En aún otros casos más, un nivel alto de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER, puede expresarse como "+++". En casos adicionales, un nivel muy alto de expresión o activación de un analito particular de interés que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER, puede expresarse como "++++".

En otros aspectos de la divulgación, el nivel de expresión y/o nivel de activación del o los marcadores se cuantifica mediante la calibración o normalización del valor de URF que se determina utilizando, por ejemplo, un ensayo de proximidad tal como CEER, frente a una curva patrón generada para un analito particular de interés. En determinados casos, un valor de unidades calculadas (UC) se puede calcular basándose en la curva patrón. En otros casos, el valor de UC se puede expresar como "-", "±", "+", "++", "+++" o "++++" de acuerdo con la descripción anterior para la intensidad de señal. El Ejemplo 3 del documento US 20120231965 proporciona un ejemplo no limitante de análisis de datos para la cuantificación de proteínas de la ruta de transducción de señal en células tales como células cancerosas.

En aspectos particulares de la divulgación, el nivel de expresión y/o nivel de activación de un marcador de interés en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada de un sujeto (por ejemplo, tejido tumoral de pulmón) se considera "similar" al nivel de expresión y/o nivel de activación del marcador idéntico en una línea celular de cáncer de pulmón cuando el nivel de expresión y/o activación de los dos marcadores es al menos aproximadamente 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idénticos entre sí.

En determinados aspectos, los métodos de la presente invención comprenden además una etapa (a') que comprende el genotipado de ácido nucleico obtenido de dicha célula cancerosa para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante en un gen,

en donde dicho gen se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un oncogén, un gen supresor tumoral y combinaciones de los mismos, o
 en donde dicho oncogén se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en KRAS, BRAE, PIK3CA, EGER y combinaciones de los mismos, o
 en donde dicho gen supresor tumoral se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en P53, STK11 y combinaciones de los mismos.

La determinación de la presencia o ausencia de dicho alelo variante junto con la determinación del nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 puede ayudar o mejorar adicionalmente la predicción de la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico. El alelo puede comprender un polimorfismo de un único nucleótido (SNP).

En aspectos particulares, los métodos de la presente divulgación comprenden además la siguiente etapa:
 (a') genotipado de la presencia o ausencia de un alelo variante (por ejemplo, mutación somática) en un sitio polimórfico en un gen tal como un oncogén o un gen supresor tumoral (por ejemplo, una o más mutaciones somáticas en uno, dos, tres, cuatro, cinco o más sitios polimórficos tales como un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en uno o más de estos genes) en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa aislada (por ejemplo, una alícuota del extracto celular utilizado en la etapa (a)).

En otras palabras, la etapa de genotipado (a') comprende analizar el extracto celular para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante (por ejemplo, SNP) en uno o más genes tales como oncogenes (por ejemplo, KRAS) o genes supresores tumorales (por ejemplo, P53 y/o STK11). En estos aspectos, el perfil de marcadores obtenido en la

etapa (a) comprende además los resultados del genotipado en la etapa (a'), de modo que el perfil de marcadores comprende el nivel de expresión y/o nivel de activación de uno o más marcadores en un extracto celular y el genotipo de uno o más genes en el extracto celular. En estos aspectos, los perfiles de marcadores conocidos (por ejemplo, perfiles de marcadores de referencia) para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón en la etapa (b) comprenden el nivel de expresión, nivel de activación y/o genotipo de los mismos marcadores utilizados para generar el perfil de marcadores en la etapa (a). En estos aspectos, la etapa de predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico se basa además en las similitudes entre los genotipos de uno o más genes de interés en el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) y los perfiles de marcadores para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón en la etapa (b), por ejemplo, si están presentes o no alelos variantes en el mismo sitio polimórfico en uno o más genes de interés. En aspectos relacionados, la etapa de seleccionar un fármaco antineoplásico adecuado para el tratamiento del cáncer de pulmón se basa además en las similitudes entre los genotipos de uno o más genes de interés en el perfil de marcadores obtenido en la etapa (a) y los perfiles de marcadores para la o las líneas celulares de cáncer de pulmón en la etapa (b), por ejemplo, si están presentes o no alelos variantes en el mismo sitio polimórfico en uno o más genes de interés.

En aspectos particulares, los métodos de la divulgación comprenden determinar la presencia o ausencia de un alelo variante junto con la determinación del nivel de expresión y/o nivel de activación de uno o más marcadores para ayudar y/o mejorar adicionalmente la predicción de la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico.

La presencia o ausencia de un alelo variante (por ejemplo, mutación somática) en un gen de interés puede determinarse utilizando un ensayo descrito en la Sección VI a continuación. Los ensayos que pueden usarse para determinar la mutación somática o el estado de alelo variante incluyen, pero sin limitación, análisis electroforético, análisis de polimorfismo de longitud de restricción, análisis de secuencia, análisis de hibridación, análisis por PCR, hibridación específica de alelos, ligamiento de oligonucleótidos, ligamiento/elongación específicos de alelo, amplificación específica de alelo, extensión de una sola base, sonda de inversión molecular, escisión invasiva, terminación selectiva, polimorfismo de longitud de restricción, secuenciación, polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), polimorfismo de cadena monocatenaria, escisión de emparejamiento erróneo, electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante y combinaciones de los mismos. Estos ensayos han sido bien descritos y se conocen en la técnica métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1984-2008), Capítulo 7 y Suplemento 47; Theophilus *et al.*, "PCR Mutation Detection Protocols", Humana Press, (2002); Innis *et al.*, *PCR Protocols*, San Diego, Academic Press, Inc. (1990); Maniatis, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Nueva York, (1982); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Genetics and Genomics*, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1984-2008); y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1984-2008). En aspectos particulares, la presencia o ausencia de uno o más alelos variantes (por ejemplo, una o más mutaciones somáticas) en uno o más genes de interés (por ejemplo, oncogenes tales como KRAS y/o genes supresores tumorales tales como P53 o STK11) se determina usando un ensayo de genotipado como se describe en el documento WO2013/026027, que reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/525.137, presentada el 18 de agosto de 2011 y la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/588.151, presentada el 18 de enero de 2012.

En determinados casos, los métodos de la presente divulgación pueden comprender además una etapa para proporcionar el resultado de la predicción o selección en la etapa (c) a un usuario (por ejemplo, un facultativo tal como un oncólogo o un médico general) en un formato legible. En algunos casos, el método puede comprender además enviar o informar del resultado de la predicción o selección en la etapa (c) a un facultativo, por ejemplo, Un oncólogo o un médico general. En otros casos, el método puede comprender además registrar o almacenar el resultado de la predicción o selección en la etapa (c) en una base de datos informática u otra máquina o dispositivo adecuado para almacenar información, por ejemplo, en un laboratorio.

Para conservar los estados de activación *in situ*, las proteínas de transducción de señales se extraen normalmente poco después de aislar las células, preferentemente en 96, 72, 48, 24, 6 o 1 h, más preferentemente en 30, 15 o 5 minutos. Las células aisladas también se pueden incubar con factores de crecimiento habitualmente a concentraciones de nanomolares a micromolares durante aproximadamente 1-30 minutos para resucitar o estimular la activación del transductor de señal (véase, por ejemplo, Irish *et al.*, *Cell*, 118:217-228 (2004)). Los factores de crecimiento estimulantes incluyen factor de crecimiento epidérmico (EGF), heregulina (HRG), TGF- α , PIGF, angiopoyetina (Ang), NRG1, PGF, TNF- α , VEGF, PDGF, IGF, FGF, HGF, citocinas y similares. Para evaluar terapias antineoplásicas potenciales para un paciente individual, las células aisladas pueden incubarse con uno o más fármacos antineoplásicos de diversas dosis antes de, durante y/o después de la estimulación del factor de crecimiento. Puede realizarse estimulación del factor de crecimiento durante varios minutos u horas (por ejemplo, de aproximadamente 1-5 minutos a aproximadamente 1-6 horas). Después del aislamiento, tratamiento con el fármaco antineoplásico y/o estimulación del factor de crecimiento, las células se lisan para extraer las proteínas de transducción de señal utilizando cualquier técnica conocida en este campo. Preferentemente, la lisis celular se inicia entre aproximadamente 1-360 minutos después de la estimulación del factor de crecimiento y más preferentemente en dos intervalos temporales diferentes: (1) aproximadamente 1-5 minutos después de la estimulación del factor de crecimiento; y (2) entre aproximadamente 30-180 minutos después de la estimulación del factor de crecimiento. Como alternativa, el lisado se puede almacenar a -80 °C hasta su uso.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el fármaco antineoplásico comprende un agente que interfiere con la función de los componentes de la ruta de transducción de señal activados en células cancerosas. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes incluyen los enumerados a continuación en la Tabla 1.

5

Tabla 1

EGFR (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	Diana de HER-4 (ErbB4)
Cetuximab Panitumumab Matuzumab Nimotuzumab Vacuna de ErbB1	Trastuzumab (Herceptin®) Pertuzumab (2C4) BMS- 599626*	Anticuerpo (U3)	
	*Heterodimerización HER-1/2; Fase 1		
EGFR (ErbB1) (B)	HER-2 (ErbB2) (D)	ErbB1/2 (F)	ErbB1/2/4 (G)
Erlotinib Gefitinib EKB 569* CL-387-785**	CP-724714 (Pfizer)	Lapatinib (Tykerb®) HKI-272* HKI-357 (Preclínica) BIBW 2992**	Canertinib* ARRY-334543 JNJ-26483327 JNJ-26483327
*(Wyeth, Irreversible, CRC II) **(Wyeth, Irreversible, Preclínica)		*Wyeth, Irreversible, CPNM I/II, Mama ** Boehringer Ingelheim, Irreversible, próstata I/II, Ovárico, Mama	*Pfizer, Irreversible, II CPNM, Mama
Raf (H)	SRC (H)	Mek: (I)	NFκB-IκB (I)
Sorafenib PLX4032 (Plexxikon)	AZ	PD-325901 (II: CPNM) AZD6244 - Matriz/Az XL518 Exelisis/ADN	
mTor (J)	PI3K (J)	VEGFR2 y VEGFR1 (K)	VEGFR1/2/3:
Rad 001: Everolimus* Temsilolimus** AP-23573***	PX-866*	Avastin (ADN) HuMV833* VEGF-Trap**	AZD 2171 (CPNM, CRC) AMG-706 (+ PDGFR)
*Everolimus (Novartis, combinación con Gefitinib/Erlotinib; I/II: CPNM, Glioblastoma) **Temsilolimus (Wyeth, combinación con Gefitinib/Erlotinib; I/II: CPNM, Glioblastoma) ***AP-23573 (Ariad, I/II: Endometrial)	* Inhibición específica de P110alfa; ProIX Pharma; CPNM preclínico	* (PDL) anti-VEGFa ** Regeneron/Aventis (Mimético de receptor) (Fase 2)	
Diana de VEGFR2 (L)			EPH A-D
DC101* IMC-IC11** IMC1121B Totalmente humanizado CDP-791*** Pazopanib****	CDP-791 (UCB) CP-547632* AG13736** E-7080 (Eisai) CHIR-258*** OSI-930 (+ cKit, PDGFR)	Bay-579352 (+ PDGFR) ABT-869* BMS-540215 (+FGFR1) KRN-951 BBIW	

(continuación)

EGFR (ErbB1) (A)	HER-2 (ErbB2) (C)	HER-3 (ErbB3) (E)	Diana de HER-4 (ErbB4)
*Imclone (¿Fase 2/3?) **IgG1 quimérico contra VEGFR2 ***Celltech, anticuerpo di-Fab pegado contra R2 **** GSK, Mieloma múltiple, ovárico, inscripción en RCC fase 3 completada, sarcoma II)	*OSI, PFIZER: (+ ErbB1 + PDGFR) (CPNM, fase 2 ovárica) **Pfizer: VEGFR1,2 y PDGFRbeta) (RCC II) *** (VEGFR1,2 FGFR3, PDGFR)	*(+CSF1R, Erk, Flt-3, PDGFR)	
ZD6474* XL647** AEE 788***	Sorafenib*		PTK787 (no cFMS, FLT-3) Sunitinib XL-999 SU-6668 (Pfizer) GSK AZ(AZD2171) BMS Novartis (AEE-788) Amgen Otros
*(vandetanib) (Fase III: tiroides, CPNM) **(Exelixis; También EPHB2): (Paciente resistente a erlotinib; pacientes asiáticos) (fase 2) *** (Novartis, Fase 1/2)	*(RCC, HCC, CPNM (III), Melanoma (III))		
Diana de PDGFR (P)	Diana de Ab1: (Q)	FTL 3	RET
Tandutinib Nilotinib	Imatinib Dasatinib Nilotinib AT-9283 AZD-0530 Bosutinib		
Diana de kit (R)	HGFR1/2	FGFR1-4	Diana de IGF-1R (S)
AMG-706 XL-880 XL-999		Chiron	Merck Pfizer Novartis
Inhibidores de HSP90:	Fármacos antimitóticos:	Otras dianas:	
IPI-504* 17-AAG**	Docetaxel* Paclitaxel** Vinblastina, Vincristina, Vinorelbina***	Inhibidores de HDAC BCL2 Productos quimioterapéuticos (desglose) Inhibidores del proteasoma	
*(Infinity Pharma, ErbB1 mutante, Mieloma múltiple I/II, GIST) **(Kosan, tumores sólidos I/II)	*(Estabilizador de microtúbulos; Cáncer de mama adyuvante y avanzado; CPNM, Cáncer de próstata independiente de andrógenos) **(Estabilizador de microtúbulos; Cáncer de mama adyuvante y avanzado; CPNM, Cáncer de ovario, Sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA) *** (Desestabilizadores de microtúbulos)		

En determinados aspectos descritos en el presente documento, el fármaco antineoplásico comprende un agente antiseñalización (es decir, un fármaco citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa; un agente antiproliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular el crecimiento descontrolado de células aberrantes tales como células cancerosas. En algunos aspectos, las células aisladas se tratan con uno o más agentes anti-señalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.

Los ejemplos de agentes antiseñalización incluyen, sin limitación, anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab (2C4), alemtuzumab (Campath®), bevacizumab (Avastin®), cetuximab (Erbix®), gemtuzumab (Mylotarg®), panitumumab (Vectibix™), rituximab (Rituxan®) y tositumomab (BEXXAR®); inhibidores de tirosina quinasa tales como gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®), erlotinib (Tarceva®), lapatinib (GW-572016; Tykerb®), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar®), mesilato de imatinib (Gleevec®), leflunomida (SU101), vandetanib (ZACTIMA™; ZD6474), pilitinib, CP-654577, CP-724714, HKI-272, PKI-166, AEE788, BMS-599626, HKI-357, BIBW-2992, ARRY-334543, JNJ-26483327 y combinaciones de los mismos.

Los agentes antiproliferativos ilustrativos incluyen inhibidores de mTOR tales como sirolimus (rapamicina), temsirolimus (CCI-779), everolimus (RAD001), BEZ-235 y XL765; inhibidores de AKT tales como 1L6-hidroximetil-qui-ro-inositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-sn-glicerocarbonato, acetato de 9-metoxi-2-metileipticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g] quinoxalin-7-il)fenil)metil)-4-piperidinil)-2H-bencimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxazina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complejo Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido de 15 unidades derivado de los aminoácidos 10-24 del protooncogén TCL1 (Hiromura *et al.*, J. Biol. Chem., 279:53407-53418 (2004), KP372-1 y los compuestos descritos en Kozikowski *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 125:1144-1145 (2003) y Kau *et al.*, Cancer Cell, 4:463-476 (2003); inhibidores de PI3K tales como PX-866, wortmanina, LY 294002, quercetina, citrato de tetrodotoxina, maleato de tioperamida, GDC-0941 (957054-30-7), IC87114, PI-103, PIK93, BEZ-235 (NVP-BEZ235), TGX-115, ZSTK474, (-)-deguelina, NU 7026, miricetina, tandutinib, GDC-0941 bismesilato, GSK690693, KU-55933, MK-2206, OSU-03012, perifosina, triciribina, XL-147, PIK75, TGX-221, NU 7441, PI 828, XL-765 y WHI-P 154; inhibidores de MEK tales como PD98059, ARRY-162, RDEA119, U0126, GDC-0973, PD184161, AZD6244, AZD8330, PD-0325901 y ARRY-142886; inhibidores de IGF-1R tales como BMS-536924; y combinaciones de los mismos.

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

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

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

Los ejemplos no limitantes de vacunas contra el cáncer útiles según la presente divulgación incluyen ANYARA de Active Biotech, DCVax-LB de Northwest Biotherapeutics, EP-2101 de IDM Pharma, GV1001 de Pharmexa, 10-2055 de Idera Pharmaceuticals, INGN 225 de Introgen Therapeutics y Stimuvax de Biomira/Merck.

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

Se describen ejemplos no limitantes de compuestos que modulan la actividad de HER2 en el presente documento e incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa y combinaciones de los mismos. En aspectos preferidos, el compuesto modulador de HER2 inhibe la actividad de HER2 y/o bloquea la señalización de HER2, por ejemplo, es un inhibidor de HER2. Los ejemplos de inhibidores de HER2 incluyen, pero sin limitación, anticuerpos

monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin®) y pertuzumab (2C4); inhibidores de tirosina quinasa de molécula pequeña tales como gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), pelitinib, CP-654577, CP-724714, canertinib (CI 1033), HKI-272, lapatinib (GW-572016; Tykerb®), PKI-166, AEE788, BMS-599626, HKI-357, BIBW-2992, ARRY-334543, JNJ-26483327 y combinaciones de los mismos. En otros aspectos, el compuesto modulador de HER2 activa la ruta de HER2, por ejemplo, es un activador de HER2.

Se describen en el presente documento ejemplos no limitantes de compuestos que modulan la actividad de c-Met e incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores de moléculas pequeñas y combinaciones de los mismos. En aspectos preferidos, el compuesto modulador de c-Met inhibe la actividad de c-Met y/o bloquea la señalización de c-Met, por ejemplo, es un inhibidor de c-Met. Los ejemplos de inhibidores de c-Met incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales tales como AMG102 y MetMAb; inhibidores de moléculas pequeñas de c-Met tales como ARQ197, JNJ-38877605, PF-2341066, PF-04217903, SGX523, GSK 1363089/ XL880, XL184, MGCD265 y MK-2461; y combinaciones de los mismos. En otros aspectos, el compuesto modulador de c-Met activa la ruta de c-Met, por ejemplo, es un activador de c-Met.

Los ejemplos no limitantes de moléculas y rutas de transducción de señal incluyen las mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2

Ruta 1	ErbB1	ErbB1 Fosfo	ErbB1 Shc	ErbB1 ubiquitina	ErbB1-PI3K	PTEN		
Ruta 2	ErbB1	ErbB1 VIII	ErbB1 VIII Fosfo	ErbB1 VIII Shc	ErbB1 VIII ubiquitina	ErbB1 VIII PI3K	PTEN	
Ruta 3	ErbB2	ErbB2 fosfo	HER-2 Shc	Complejo de ErbB2: PI3K	ErbB2 ubiquitina	PTEN		
Ruta 4	ErbB2	P95 Truncado ErbB2	ErbB2 fosfo	P95 truncado ERBB2 fosfo	HER-2 Shc	Complejo de ERBB2: PI3K	ErbB2 ubiquitina	P95ErbB2:PI3K
Ruta 5	ErbB3	ErbB3 Fosfo	Complejo de ErbB3: PI3K	ErbB3 PI3K fosfo	ErbB3:Shc			
Ruta 6	ErbB4	ErbB4 Fosfo	ErbB4:Shc					
Ruta 7	IGF-1R	IGF-1R fosfo	IGF-1R:IRS	IRS:PI3K	Fosfo IRS	IGF-1R:PI3K		
Ruta 8	INSR	INSR fosfo						
Ruta 9	KIT	KIT fosfo						
Ruta 10	FLT3	FLT3 fosfo						
Ruta 11	HGFR 1	HGFR 1 Fosfo						
Ruta 12	HGFR2	HGFR2 fosfo						
Ruta 13	RET	RET fosfo						
Ruta 14	PDGFR alfa	PDGFR alfa fosfo						
Ruta 15	PDGFR beta	PDGFR beta fosfo						
Ruta 16	VEGFR 1	VEGFR 1 fosfo	Complejo de VEGFR 1:PLCy	VEGFR 1: Src				
Ruta 17	VEGFR 2	VEGFR 2 fosfo	Complejo de VEGFR 2:PLCy	VEGFR 2: Src	Complejo de VEGFR-2/sulfato de heparina	VEGFR-2, Complejo de VE-cadherina		
Ruta 18	VEGFR 3	VEGFR 3 fosfo						
Ruta 19	FGFR 1	FGFR 1 fosfo						
Ruta 20	FGFR 2	FGFR 2 fosfo						
Ruta 21	FGFR 3	FGFR 3 fosfo						
Ruta 22	FGFR 4	FGFR 4 fosfo						
Ruta 23	TIE 1	TIE 1 fosfo						
Ruta 24	TIE 2	TIE 2 fosfo						
Ruta 25	EPHA	EPHA fosfo						

(continuación)

Ruta 26	EPHB	EPHB fosfo						
Ruta 27	Complejo de NFkB-IkB	fosfo-IkB (S32) IkB total	NFkB total Fosfo NFkB (S536)	P65 Total Fosfo P65 IkBa				
Ruta 28	ER	Fosfo ER	ER-AIB1	Otros complejos de ER				
Ruta 29	PR	Fosfo Pr		Complejos de PR				
Ruta 30	Ruta de hedgehog							
Ruta 31	Ruta de Wnt							
Ruta 32	Ruta de notch							
Ruta 33	Mek Total Fosfo Mek (S217/S2 21)	Erk total Fosfo Erk (T202/Y204)	Rsk-1 total fosfo Rsk-1 (T357/S363)	Stat3 total Fosfo Stat-3 (Y705) (S727) Stat 1 total Fosfo Stat1 (Y 701)	Fosfo Bad (S112) Bad (total)	Fak total Fosfo Fak (Y576)	cSrc total Fosfo cSrc (Y416)	Ras total Fosfo Ras
Ruta 34	Akt (total) Fosfo Akt (T473)	Fosfo Akt (T308)	Fosfo Bad (S112) Bad (total)	Fosfo Bad (S136)	Bad: complejo 14-3-3	mTor total Fosfo mTor (S2448)	p70S6K total Fosfo p70S6K (T229) (T389)	GSK3beta Total (Fosfo Ser 9)
Ruta 35	Jnk total Fosfo Jnk (T183/Y1 85)	P38 total Fosfo P38 (T180/Y182)	Rb total Fosfo Rb (S249/T252) Fosfo Rb (S780)	P53 total Fosfo p53 (S392) Fosfo p53 (S20)	fosfo-CREB (S133) CREB total	c-Jun total Fosfo-c-Jun; (S63)	Paxilina total Fosfo Paxilina (Y118)	
Ruta 36	Ki67	Caspasa escindida 3,8,9 otros	T0P02					
Ruta 37	TGFbeta							

Los ejemplos no limitantes de analitos tales como moléculas de transducción de señal que se pueden investigar en una muestra tal como un extracto celular de una línea celular o tejido tumoral incluyen, sin limitación, tirosina quinasas receptoras, tirosina quinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos. En determinados casos, la pluralidad de moléculas de transducción de señales se selecciona del grupo que consiste en EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), p95HER2, HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4), PI3K, SHC, Raf, SRC, MEK, NFkB-IkB, mTOR, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), VEGF, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, EPH-A, EPH-B, EPH-C, EPH-D, c-MET, FGFR, c-KIT, FLT-3, TIE-1, TIE-2, c-FMS, PDGFRA, PDGFRB, Abl, FTL 3, RET, HGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, IGF-1R, ER, PR, NCOR, AIB1, AKT, ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PDK1, PDK2, PTEN, SGK3, 4E-BP1, P70S6K, proteína tirosina fosfatasas (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), dímeros de receptores, GSK-3 β , PIP2, PIP3, p27 y combinaciones de los mismos.

En un aspecto particular, la presente divulgación comprende determinar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o nivel de activación (por ejemplo, nivel de fosforilación o formación de complejos) de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más marcadores tales como los siguientes analitos: HER1, HER2, HER3, p95HER2, cMET, IGF-1R, cKIT, PI3K (por ejemplo, PIK3CA y/o PIK3R1), SHC y/o VEGFR (por ejemplo, VEGFR1, 2 y/o 3).

En determinados aspectos preferidos, la presente divulgación comprende (i) determinar el nivel de expresión de al menos uno o más de HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R, PI3K y/o SHC y/o (ii) determinar el nivel de activación de al menos uno o más de HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R, PI3K y/o SHC. En algunos aspectos, el nivel de activación corresponde a un nivel de fosforilación de HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R y/o SHC. En otros aspectos determinados, el nivel de activación corresponde a un nivel de un complejo de PI3K. Los ejemplos de complejos de PI3K incluyen, sin limitación, uno o más complejos que comprenden un par de tirosina quinasas receptoras dimerizado, una subunidad p85 de PI3K (por ejemplo, PIK3R1) y una subunidad p110 de PI3K (por ejemplo, una subunidad α o β tal como PIK3CA o PIK3CB); véase, por ejemplo, WO2013/033623 (que reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/530.621, presentada el 2 de septiembre de 2011).

En determinados aspectos, la presente divulgación comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o nivel de activación (por ejemplo, nivel de fosforilación o formación de complejos) de uno o más (por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales en un extracto celular. En algunos aspectos, el o los (por ejemplo, al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más) analitos adicionales comprenden una o más moléculas de transducción de señal seleccionadas del grupo que consiste en tirosina quinasas receptoras, tirosina quinasas no receptoras, componentes de la cascada de señalización de tirosina quinasa, receptores de hormonas nucleares, coactivadores de receptores nucleares, represores de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

En aspectos particulares, la presente divulgación comprende además determinar el nivel de expresión (por ejemplo, cantidad total) y/o nivel de activación (por ejemplo, nivel de fosforilación o formación de complejos) de uno o cualquier combinación de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 o más de los siguientes analitos adicionales: HER4, AKT, ERK1 (MAPK3), ERK2 (MAPK1), MEK, PTEN, SGK3, 4E-BP1, PDK1, PDK2, GSK-3 β , Raf, SRC, NFkB-IkB, mTOR, EPH-A, EPH-B, EPH-C, EPH-D, FLT-3, TIE-1, TIE-2, c-FMS, Abl, FTL 3, RET, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, ER, PR, NCOR, AIB1, RON, PIP2, PIP3, p27, PDGFR (por ejemplo, PDGFRA y/o B), p70S6K, proteína tirosina fosfatasas (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), dímeros de receptores y combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, la determinación del nivel de expresión del o los analitos comprende detectar la cantidad total de cada uno del o los analitos en el extracto celular con uno o más anticuerpos específicos para el analito correspondiente. En aspectos particulares, los anticuerpos se unen al analito independientemente del estado de activación del analito para detectar, es decir, los anticuerpos detectan las formas tanto inactivadas como activadas del analito.

El nivel de expresión total y/o el estado pueden determinarse utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas. En determinados aspectos, el nivel de expresión total y/o el estado de cada uno del o los analitos tales como moléculas de transducción de señal en una muestra tal como un extracto celular de una línea celular (por ejemplo, línea celular de cáncer de pulmón) o tejido tumoral (por ejemplo, tejido tumoral de pulmón) se detecta con un inmunoensayo tal como un ensayo de detección único o un ensayo de detección doble de proximidad (por ejemplo, un inmunoensayo reactivo potenciado de enzimas colaborativas (CEER)) como se describe en el presente documento.

En determinados aspectos, la determinación de los niveles de expresión (por ejemplo, totales) de uno o más analitos comprende:

(i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) un extracto celular producido a partir de una célula con una o una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura (por ejemplo, anticuerpos de captura específicos para uno o más analitos) para formar una pluralidad de analitos capturados, en donde los anticuerpos de captura están

restringidos sobre un soporte sólido (por ejemplo, para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y anticuerpos de captura);

(ii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes (por ejemplo, primer y segundo anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los uno o más analitos) para formar una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos de detección),

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

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

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

En otros aspectos determinados, la determinación de los niveles de expresión (por ejemplo, totales) del o los analitos que son receptores truncados (por ejemplo, p95HER2) comprende:

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

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

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

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

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

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

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

Los primeros anticuerpos independientes del estado de activación se pueden marcar directamente con el resto facilitador o marcar indirectamente con el resto facilitador, por ejemplo, mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los primeros anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con el resto facilitador. De forma similar, los segundos anticuerpos independientes del estado de activación se pueden marcar directamente con el primer miembro del par de amplificación de señal o marcar indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de señal, por ejemplo, mediante unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con los segundos anticuerpos independientes del estado de activación y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de señal. En determinados casos, el primer miembro del par de unión es biotina y el segundo miembro del par de unión es una avidina tal como estreptavidina o neutravidina.

En algunos aspectos, el resto facilitador puede ser, por ejemplo, glucosa oxidasa. En determinados casos, la glucosa oxidasa y los primeros anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo como se describe en, por ejemplo, los Ejemplos 16-17 de la publicación de PCT N.º WO2009/108637. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 500 kDa (por ejemplo, aproximadamente 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o 750 kDa). En otros aspectos, el agente oxidante puede ser, por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H₂O₂). En otros aspectos

- más, el primer miembro del par de amplificación de señal puede ser, por ejemplo, una peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRP). En aspectos adicionales, el segundo miembro del par de amplificación de señal puede ser, por ejemplo, un reactivo de tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida). Preferentemente, la señal amplificada se genera mediante oxidación por peroxidasa de biotina-tiramida para producir una tiramida activada (por ejemplo, para transformar la biotina-tiramida en una tiramida activada). La tiramida activada puede detectarse directa o indirectamente, por ejemplo, tras la adición de un reactivo detector de señal. Los ejemplos no limitantes de reactivos detectores de señales incluyen fluoróforos marcados con estreptavidina y combinaciones de peroxidasa marcada con estreptavidina y reactivos cromogénicos tales como, por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB).
- 10 En determinados casos, la peroxidasa de rábano picante y los segundos anticuerpos independientes del estado de activación pueden conjugarse con una molécula de dextrano activada por sulfhidrilo. La molécula de dextrano activada por sulfhidrilo tiene normalmente un peso molecular de aproximadamente 70 kDa (por ejemplo, aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 kDa).
- 15 El receptor truncado es normalmente un fragmento del receptor de longitud completa y comparte una región de unión a dominio intracelular (ICD) con el receptor de longitud completa. En determinados aspectos, el receptor de longitud completa comprende una región de unión a dominio extracelular (ECD), un dominio transmembrana y una región de unión a dominio intracelular (ICD). Sin quedar ligado a ninguna teoría particular, el receptor truncado puede surgir a través del procesamiento proteolítico del ECD del receptor de longitud completa o mediante el inicio alternativo de la traducción de restos de metionina que se localizan antes, dentro o después del dominio transmembrana, por ejemplo, para crear un receptor truncado con un ECD acortado o un receptor truncado que comprenda un fragmento de ICD asociado a membrana o citosólico.
- 20 En determinados aspectos preferidos, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa correspondiente es HER2. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos descritos en el presente documento para detectar proteínas truncadas se pueden aplicar a varias proteínas diferentes, incluyendo, pero sin limitación, el mutante de EGFR VIII (implicado en el glioblastoma, cáncer colorrectal, etc.), otras tirosina quinasas receptoras truncadas, caspasas y similares. El ejemplo 12 de la publicación de PCT n.º WO2009/108637 proporciona una realización ejemplar de los métodos de ensayo de la presente divulgación para detectar receptores truncados tales como p95HER2 en células que usan un ELISA de micromatrices múltiple, de alto rendimiento, de detección doble de proximidad que tiene rango dinámico superior.
- 25 En algunos aspectos, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a ECD comprende un par de estreptavidina-biotina, en donde la estreptavidina está unida a la perla y la biotina está unida a un anticuerpo. En determinados casos, el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa).
- 30 En algunos aspectos, cada serie de diluciones de anticuerpos de captura comprende una serie de concentraciones de anticuerpos de captura descendentes. En determinados casos, los anticuerpos de captura se diluyen en serie al menos 2 veces (por ejemplo, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 500 o 1000 veces) para producir una serie de diluciones que comprende un número establecido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o más) de concentraciones de anticuerpos de captura descendentes que se aplican puntualmente en una matriz. Preferentemente, al menos 2, 3, 4, 5 o 6 repeticiones de cada dilución de anticuerpo de captura se aplican puntualmente en la matriz.
- 35 En otros aspectos, el soporte sólido comprende vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, alfileres, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, difluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En un aspecto preferido, los anticuerpos de captura están restringidos (por ejemplo, mediante interacciones covalentes o no covalentes) en portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa tales como, por ejemplo, portaobjetos FAST®, que están disponibles en el mercado de Whatman Inc. (Florham Park, NJ). Se describen métodos ilustrativos para construir matrices de anticuerpos adecuadas para su uso de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, en la publicación de PCT n.º WO2009/108637.
- 40 En aspectos adicionales, la determinación de los niveles de activación del o los analitos comprende detectar un nivel de fosforilación del o los analitos en el extracto celular con anticuerpos específicos para la forma fosforilada de cada uno de los analitos para detectar.
- 45 Los niveles y/o el estado de fosforilación pueden determinarse utilizando cualquiera de una diversidad de técnicas. Por ejemplo, es bien sabido en la técnica que pueden detectarse proteínas fosforiladas mediante inmunoensayos utilizando anticuerpos que reconocen específicamente la forma fosforilada de la proteína (véase, por ejemplo, Lin *et al.*, Br. J. Cancer, 93:1372-1381 (2005)). Los inmunoensayos incluyen en general inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), RIA y ELISA. Los tipos más específicos de inmunoensayos incluyen captura de antígeno/competición de antígeno, captura de anticuerpos/competición de antígenos, sándwiches de dos anticuerpos, captura de anticuerpos/exceso de anticuerpos y captura de anticuerpos/exceso de antígenos. Se describen en el presente documento métodos para producir anticuerpos y en Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Estados Unidos. Se pueden realizar anticuerpos fosfoespecíficos *de novo* u obtenerse de fuentes comerciales o no comerciales. Los niveles y/o el estado de

fosforilación también pueden determinarse marcando metabólicamente células con fosfato radiactivo en forma de [γ - ^{32}P]ATP o [γ - ^{33}P]ATP. Las proteínas fosforiladas se vuelven radiactivas y, por lo tanto, se rastreables y cuantificables a través del recuento de centelleo, radiografía y similares (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, J. Biol. Chem., 253:7605-7608 (1978)). Por ejemplo, pueden extraerse proteínas marcadas metabólicamente de células, separarse mediante electroforesis en gel, transferirse a una membrana, explorarse con un anticuerpo específico para un analito particular y someterse a autorradiografía para detectar ^{32}P o ^{33}P . Como alternativa, el gel puede someterse a autorradiografía antes de transferencia a membrana y exploración de anticuerpos.

En aspectos particulares, el nivel y/o el estado de activación (por ejemplo, fosforilación) de cada uno del o los analitos en una muestra tal como un extracto celular de una línea celular (por ejemplo, línea celular de cáncer de pulmón) o tejido tumoral (por ejemplo, tejido tumoral de pulmón) se detecta con un inmunoensayo tal como un ensayo de detección único o un ensayo de detección doble de proximidad (por ejemplo, un inmunoensayo reactivo potenciado de enzimas colaborativas (CEER)) como se describe en el presente documento.

En determinados aspectos, la determinación del nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) del o los analitos comprende:

(i) incubar (por ejemplo, poner en contacto) un extracto celular producido a partir de una célula con una serie de diluciones de anticuerpos de captura (por ejemplo, anticuerpos de captura específicos para uno o más analitos) para formar una pluralidad de analitos capturados, en donde los anticuerpos de captura están restringidos sobre un soporte sólido (por ejemplo, para transformar los analitos presentes en el extracto celular en complejos de analitos capturados que comprenden los analitos y anticuerpos de captura);

(ii) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación específicos para el o los analitos) y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para los analitos correspondientes (por ejemplo, anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para el o los analitos) para formar una pluralidad de analitos capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de analitos capturados en complejos de analitos capturados detectables que comprenden los analitos capturados y anticuerpos de detección),

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

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

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

En otros aspectos determinados, la determinación del nivel de activación (por ejemplo, fosforilación) del o los analitos que son receptores truncados (por ejemplo, p95HER2) comprende:

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

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

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

(iv) incubar (por ejemplo, poner en contacto) la pluralidad de receptores truncados capturados con anticuerpos de detección que comprenden anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación específicos para una región de unión a ICD del receptor de longitud completa (por ejemplo, HER2 de longitud completa) para formar una pluralidad de receptores truncados capturados detectables (por ejemplo, para transformar los complejos de receptores truncados capturados en complejos de receptores truncados capturados detectables que comprenden los receptores truncados capturados y anticuerpos de detección), en donde los anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitador, los anticuerpos dependientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de señal y el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señal;

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

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

Los anticuerpos independientes del estado de activación se pueden marcar directamente con el resto facilitador o marcar indirectamente con el resto facilitador, por ejemplo, mediante hibridación entre un oligonucleótido conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un oligonucleótido complementario conjugado con el resto facilitador. De forma similar, los anticuerpos dependientes del estado de activación se pueden marcar directamente con el primer miembro del par de amplificación de señal o marcar indirectamente con el primer miembro del par de amplificación de señal, por ejemplo, mediante unión entre un primer miembro de un par de unión conjugado con los anticuerpos dependientes del estado de activación y un segundo miembro del par de unión conjugado con el primer miembro del par de amplificación de señal. En determinados casos, el primer miembro del par de unión es biotina y el segundo miembro del par de unión es una avidina tal como estreptavidina o neutravidina.

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

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

El receptor truncado es normalmente un fragmento del receptor de longitud completa y comparte una región de unión a dominio intracelular (ICD) con el receptor de longitud completa. En determinados aspectos, el receptor de longitud completa comprende una región de unión a dominio extracelular (ECD), un dominio transmembrana y una región de unión a dominio intracelular (ICD). Sin quedar ligado a ninguna teoría particular, el receptor truncado puede surgir a través del procesamiento proteolítico del ECD del receptor de longitud completa o mediante el inicio alternativo de la traducción de restos de metionina que se localizan antes, dentro o después del dominio transmembrana, por ejemplo, para crear un receptor truncado con un ECD acortado o un receptor truncado que comprenda un fragmento de ICD asociado a membrana o citosólico.

En determinados aspectos preferidos, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa correspondiente es HER2. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que los métodos descritos en el presente documento para detectar proteínas truncadas se pueden aplicar a varias proteínas diferentes, incluyendo, pero sin limitación, el mutante de EGFR VIII (implicado en el glioblastoma, cáncer colorrectal, etc.), otras tirosina quinasas receptoras truncadas, caspasas y similares. El ejemplo 12 de la publicación de PCT n.º WO2009/108637 proporciona una realización ejemplar de los métodos de ensayo de la presente divulgación para detectar receptores truncados tales como p95HER2 en células que usan un ELISA de micromatrices múltiple, de alto rendimiento, de detección doble de proximidad que tiene rango dinámico superior.

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

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

En otros aspectos, el soporte sólido comprende vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, afilieres, filtros, perlas, papel, membrana (por ejemplo, nailon, nitrocelulosa, difluoruro de polivinilideno (PVDF), etc.), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. En un aspecto preferido, los anticuerpos de captura están

restringidos (por ejemplo, mediante interacciones covalentes o no covalentes) en portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa tales como, por ejemplo, portaobjetos FAST®, que están disponibles en el mercado de Whatman Inc. (Florham Park, NJ). Se describen métodos ilustrativos para construir matrices de anticuerpos adecuadas para su uso de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, en la publicación de PCT n.º WO2009/108637.

IV. Ensayos individuales de detección

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

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

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

Los ensayos de dos anticuerpos descritos en el presente documento son normalmente matrices basadas en anticuerpos que comprenden una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes localizaciones direccionables. Se han descrito anteriormente ejemplos de soportes sólidos adecuados para su uso de acuerdo con la presente divulgación.

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

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

La tiramida activada se detecta directamente o se detecta tras la adición de un reactivo detector de señal tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, un colorante Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, Texas red, isotiocianato de tetrarrodamina (TRITC), un fluoróforo CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similares. El marcador de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente con el fluoróforo o la peroxidasa usando métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de reactivos cromogénicos incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

Un protocolo ilustrativo para realizar los ensayos de dos anticuerpos descritos en el presente documento se

proporciona en el Ejemplo 3 de la publicación de PCT n.º WO2009/108637.

En otro ejemplo de un enfoque de dos anticuerpos, la presente divulgación proporciona un método para detectar la expresión o el nivel de activación de un receptor truncado, comprendiendo el método:

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

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

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

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona kits para realizar los ensayos de dos anticuerpos descritos anteriormente que comprenden: (a) una serie de diluciones de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura restringidos sobre un soporte sólido; y (b) uno o una pluralidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, anticuerpos independientes del estado de activación y/o anticuerpos dependientes del estado de activación). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para métodos de uso del kit para detectar los niveles de expresión y/o estados de activación de una o una pluralidad de moléculas de transducción de señal de células tales como células tumorales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales descritos anteriormente con respecto a la realización de los métodos específicos de la presente divulgación tales como, por ejemplo, primer y segundo miembros del par de amplificación de señal, reactivos de amplificación de señal de tiramida, tampones de lavado, etc.

V. Ensayos de detección doble de proximidad

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

En un aspecto particular, el ensayo de proximidad para detectar el nivel o estado de activación de un analito de interés

comprende:

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

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

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

En determinados aspectos, el receptor truncado es p95HER2 y el receptor de longitud completa es HER2. En otro aspecto determinado, la pluralidad de perlas específicas para una región de unión a dominio extracelular (ECD) comprende un par de estreptavidina-biotina, en donde la biotina está unida a la perla y la biotina está unida a un anticuerpo (por ejemplo, en donde el anticuerpo es específico para la región de unión a ECD del receptor de longitud completa).

En un aspecto alternativo, los anticuerpos dependientes del estado de activación pueden marcarse con un resto facilitador y los anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un primer miembro de un par de amplificación de señal.

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

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

- (i) incubar el extracto celular con una o una pluralidad de series de diluciones de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados;
- (ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden uno o una pluralidad de los primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación específicos para que los analitos correspondientes formen una pluralidad de analitos capturados detectables,
- en donde los primeros anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un resto facilitador,

los segundos anticuerpos independientes del estado de activación están marcados con un primer miembro de un par de amplificación de señal y el resto facilitador genera un agente oxidante que se canaliza a y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señal;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En aspectos alternativos, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un primer miembro de un par de amplificación de señal y los segundos anticuerpos independientes del estado de activación pueden marcarse con un resto facilitador.

Los ensayos de proximidad descritos en el presente documento son normalmente matrices basadas en anticuerpos que comprenden uno o una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes localizaciones direccionables. Se han descrito anteriormente ejemplos de soportes sólidos adecuados para su uso en la presente divulgación.

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

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

En determinados casos, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de activación de uno o más de los analitos o, como alternativa, los primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar los niveles de expresión de uno o más de los analitos se marcan directamente con el resto facilitador. El resto facilitador puede acoplarse con anticuerpos independientes del estado de activación usando métodos bien

conocidos en la técnica. Un resto facilitador adecuado para su uso en la presente divulgación incluye cualquier molécula capaz de generar un agente oxidante que se canaliza (es decir, se dirige a) y reacciona con (es decir, se une, está unida con o forma un complejo con) otra molécula próxima (es decir, espacialmente cerca o cercana) al resto facilitador. Los ejemplos de restos facilitadores incluyen, sin limitación, enzimas tales como glucosa oxidasa o cualquier
 5 otra enzima que catalice una reacción de oxidación/reducción que implique oxígeno molecular (O_2) como el aceptor de electrones y fotosensibilizadores como azul de metileno, rosa de bengala, porfirinas, colorantes de escuarato, ftalocianinas y similares. Los ejemplos no limitantes de agentes oxidantes incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un oxígeno singulete y cualquier otro compuesto que transfiera átomos de oxígeno o gane electrones en una reacción de oxidación/reducción. Preferentemente, en presencia de un sustrato adecuado (por ejemplo, glucosa, luz, etc.), el resto
 10 facilitador (por ejemplo, glucosa oxidasa, fotosensibilizador, etc.) genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno simple, etc.) que se canaliza y reacciona con el primer miembro del par de amplificación de señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), hapteno protegido por un grupo protector, una enzima inactivada por enlace tioéter a un inhibidor enzimático, etc.) cuando los dos restos están próximos entre sí.

En otros casos determinados, los anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de activación de uno o más de los analitos o, como alternativa, primeros anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión de uno o más de los analitos se marcan indirectamente con el resto facilitador mediante hibridación entre un conector oligonucleotídico conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación y un conector oligonucleotídico complementario conjugado con el resto facilitador. Los conectores oligonucleotídicos se pueden acoplar al resto facilitador o a los anticuerpos independientes del estado de activación utilizando métodos bien conocidos en la técnica. En algunos aspectos, el conector oligonucleotídico conjugado con el resto facilitador tiene 100 % de complementariedad con el conector oligonucleotídico conjugado con los anticuerpos independientes del estado de activación. En otros aspectos, el par de conectores oligonucleotídicos comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más regiones de emparejamiento erróneo, por ejemplo, tras hibridación en condiciones de hibridación rigurosas. Un experto en la materia apreciará que los anticuerpos independientes del estado de activación específicos para diferentes analitos pueden conjugarse con el mismo conector oligonucleotídico o con diferentes conectores oligonucleotídicos.

La longitud de los conectores oligonucleotídicos que se conjugan con el resto facilitador o con los anticuerpos independientes del estado de activación puede variar. En general, la secuencia del conector puede tener al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75 o 100 nucleótidos de longitud. Normalmente, se generan secuencias de ácido nucleico aleatorias para acoplamiento. Como un ejemplo no limitante, se puede diseñar una biblioteca de conectores oligonucleotídicos para tener tres dominios contiguos distintos: un dominio espaciador; dominio de identificación; y dominio de conjugación. Preferentemente, los conectores oligonucleotídicos están diseñados para acoplamiento eficaz sin destruir la función del resto facilitador o anticuerpos independientes del estado de activación con los que están conjugados.

Las secuencias de conectores oligonucleotídicos pueden diseñarse para prevenir o minimizar cualquier formación de estructura secundaria en una diversidad de condiciones de ensayo. Las temperaturas de fusión normalmente se supervisan cuidadosamente para cada segmento dentro del conector para permitir su participación en los procedimientos de ensayo generales. En general, el intervalo de temperaturas de fusión del segmento de la secuencia del conector está entre 1-10 °C. Pueden usarse algoritmos informáticos (por ejemplo, OLIGO 6.0) para determinar la temperatura de fusión, estructura secundaria y estructura en horquilla en concentraciones iónicas definidas para analizar cada uno de los tres dominios diferentes dentro de cada conector. Las secuencias combinadas globales también pueden analizarse para determinar su caracterización estructural y su comparabilidad con otras secuencias de conectores oligonucleotídicos conjugadas, por ejemplo, si se hibridarán en condiciones de hibridación rigurosas con un conector oligonucleotídico complementario.

La región espaciadora del conector oligonucleotídico proporciona una separación adecuada del dominio de conjugación del sitio de reticulación del oligonucleótido. El dominio de conjugación actúa para unir las moléculas marcadas con una secuencia de conector oligonucleotídico complementaria al dominio de conjugación mediante hibridación de ácido nucleico. La hibridación mediada por ácido nucleico puede realizarse antes o después de la formación del complejo de anticuerpo-analito (es decir, antígeno), proporcionando un formato de ensayo más flexible. A diferencia de muchos métodos de conjugación de anticuerpos directos, la unión de oligonucleótidos relativamente pequeños con anticuerpos u otras moléculas tiene una influencia mínima en la afinidad específica de los anticuerpos hacia su analito diana o en la función de las moléculas conjugadas.

En algunos aspectos, el dominio de secuencia de identificación del conector oligonucleotídico puede usarse en ensayos de proteínas multiplexadas complejos. Se pueden conjugar múltiples anticuerpos con conectores oligonucleotídicos con diferentes secuencias de identificación. En inmunoensayos múltiples, pueden usarse secuencias de oligonucleótidos indicadoras marcadas con sondas apropiadas se pueden usar para detectar la reactividad cruzada entre anticuerpos y sus antígenos en el formato de ensayo múltiple.

Los conectores oligonucleotídicos pueden conjugarse con anticuerpos u otras moléculas usando varios métodos diferentes. Por ejemplo, se pueden sintetizar conectores oligonucleotídicos con un grupo tiol en el extremo 5' o 3'. El grupo tiol puede desprotegerse utilizando agentes reductores (por ejemplo, TCEP-HCl) y los conectores resultantes

pueden purificarse utilizando una columna de centrifugación desalinizadora. Los conectores oligonucleotídicos desprotegidos resultantes pueden conjugarse con las aminas primarias de anticuerpos u otros tipos de proteínas utilizando reticuladores heterobifuncionales tales como SMCC. Como alternativa, los grupos 5'-fosfato en oligonucleótidos pueden tratarse con EDC de carbodiimida hidrosoluble para formar ésteres de fosfato y posteriormente acoplarse con moléculas que contienen amina. En determinados casos, el diol en el resto de 3'-ribosa puede oxidarse a grupos aldehído y después conjugarse con los grupos amina de anticuerpos u otros tipos de proteínas usando aminación reductora. En otros casos determinados, el conector oligonucleotídico puede sintetizarse con una modificación de biotina en el extremo 3' o 5' y conjugarse con moléculas marcadas con estreptavidina.

Pueden sintetizarse conectores oligonucleotídicos usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en este campo, tales como las descritas en Usman *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe *et al.*, Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott *et al.*, Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); y Wincott *et al.*, Methods Mol. Bio., 74:59 (1997). En general, la síntesis de oligonucleótidos hace uso de grupos de protección y acoplamiento de ácidos nucleicos habituales, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Los expertos en la técnica conocen reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, métodos para la desprotección de ácidos nucleicos y métodos para la purificación de ácidos nucleicos.

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

En un ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es glucosa oxidasa (GO) y el primer miembro del par de amplificación de señal es peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato tal como glucosa, que genera un agente oxidante (es decir, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Si la HRP está dentro a una distancia de canalización a la GO, el H_2O_2 generado por la GO se canaliza y forma un complejo con la HRP para formar un complejo de HRP- H_2O_2 , que, en presencia del segundo miembro del par de amplificación de señal (por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico tal como tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida), ácido homovanílico o ácido 4-hidroxifenil acético), genera una señal amplificada. Se describen métodos de uso de GO y HRP en un ensayo de proximidad en, por ejemplo, Langry *et al.*, Informe del Departamento de Energía de los Estados Unidos N.º UCRL-ID-136797 (1999). Cuando se usa biotina-tiramida como el segundo miembro del par de amplificación de señal, el complejo de HRP- H_2O_2 oxida la tiramida para generar un radical de tiramida reactivo que se une covalentemente con restos nucleofílicos cercanos. La tiramida activada se detecta directamente o se detecta tras la adición de un reactivo detector de señal tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, un colorante Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, Texas red, isotiocianato de tetraarrodamina (TRITC), un flúor CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similares. El marcador de estreptavidina se puede acoplar directa o indirectamente con el fluoróforo o la peroxidasa usando métodos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de reactivos cromogénicos incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN) y/o porfirinógeno.

En otro ejemplo de canalización de proximidad, el resto facilitador es un fotosensibilizador y el primer miembro del par de amplificación de señal es una molécula grande marcada con múltiples haptenos que están protegidos con grupos protectores que impiden la unión de los haptenos con un compañero de unión específico (por ejemplo, ligando, anticuerpo, etc.). Por ejemplo, el miembro del par de amplificación de señal puede ser una molécula de dextrano marcada con biotina protegida, cumarina y/o moléculas de fluoresceína. Los grupos protectores adecuados incluyen, pero sin limitación, grupos protectores de fenoxi, analino, olefina, tioéter y selenoéter. Se describen fotosensibilizadores adicionales y moléculas de hapteno protegidas adecuadas para su uso en los ensayos de proximidad de la presente invención en la patente de los Estados Unidos n.º 5.807.675. Cuando el fotosensibilizador se excita con luz, genera un agente oxidante (es decir, oxígeno singulete). Si las moléculas de hapteno se encuentran

a una distancia de canalización al fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza y reacciona con tioéteres en los grupos protectores de los haptenos para producir grupos carbonilo (cetonas o aldehídos) y ácido sulfínico, liberando los grupos protectores de los haptenos. Después, los haptenos desprotegidos están disponibles para unirse específicamente al segundo miembro del par de amplificación de señal (por ejemplo, un compañero de unión específico que puede generar una señal detectable). Por ejemplo, cuando el hapteno es biotina, el compañero de unión específico puede ser una estreptavidina marcada con enzima. Las enzimas ilustrativas incluyen fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, HRP, etc. Después de lavar para retirar reactivos no unidos, la señal detectable se puede generar añadiendo un sustrato detectable (por ejemplo, fluorescente, quimioluminiscente, cromogénico, etc.) de la enzima y detectarse utilizando métodos e instrumentación adecuados conocidos en la técnica. Como alternativa, la señal detectable se puede amplificar utilizando amplificación de señal de tiramida y la tiramida activada se puede detectar directamente o se puede detectar tras la adición de un reactivo de detección de señal como se ha descrito anteriormente.

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

En un ejemplo adicional de canalización de proximidad, el resto facilitador es HRP, el primer miembro del par de amplificación de señal es un hapteno protegido o un complejo de enzima-inhibidor como se ha descrito anteriormente y los grupos protectores comprenden p-alcoxifenol. La adición de fenilendiamina y H_2O_2 genera una fenilendiimina reactiva que se canaliza al hapteno protegido o al complejo de enzima-inhibidor y reacciona con grupos protectores de p-alcoxifenol para producir haptenos expuestos o una enzima reactiva. La señal amplificada se genera y detecta como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, Patentes de los Estados Unidos n.º 5.532.138 y 5.445.944).

Un protocolo ilustrativo para realizar los ensayos de proximidad descritos en el presente documento se proporciona en el Ejemplo 4 de la publicación de PCT n.º WO2009/108637.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona kits para realizar los ensayos de proximidad descritos anteriormente que comprenden: (a) una serie de diluciones de uno o una pluralidad de anticuerpos de captura restringidos sobre un soporte sólido; y (b) uno o una pluralidad de anticuerpos de detección (por ejemplo, una combinación de anticuerpos independientes del estado de activación y anticuerpos dependientes del estado de activación para detectar niveles de activación y/o una combinación de primeros y segundos anticuerpos independientes del estado de activación para detectar niveles de expresión). En algunos casos, los kits pueden contener además instrucciones para métodos de uso del kit para detectar la expresión y/o estado de activación de una o una pluralidad de moléculas de transducción de señal de células tales como células tumorales. Los kits también pueden contener cualquiera de los reactivos adicionales descritos anteriormente con respecto a la realización de los métodos específicos de la presente divulgación tales como, por ejemplo, primer y segundo miembros del par de amplificación de señal, reactivos de amplificación de señal de tiramida, sustratos para el resto facilitador, tampones de lavado, etc.

VI. Métodos de genotipado

Se puede usar una diversidad de medios para genotipar un individuo en un sitio polimórfico en uno o más genes tales como oncogenes y/o genes supresores tumorales para determinar si una muestra (por ejemplo, una muestra de ácido nucleico) contiene un alelo variante específico (por ejemplo, mutación somática) y/o haplotipo. Por ejemplo, puede usarse convenientemente amplificación enzimática de ácido nucleico de un individuo para obtener ácido nucleico para análisis posterior. La presencia o ausencia de un alelo variante específico (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en uno o más genes de interés también se puede determinar directamente a partir del ácido nucleico del individuo sin amplificación enzimática. En determinados aspectos, un individuo es genotipado en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sitios polimórficos tales como un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en uno o más genes de interés.

Se puede realizar genotipado de ácido nucleico de un individuo, ya sea amplificado o no, utilizando cualquiera de diversas técnicas. Las técnicas útiles incluyen, sin limitación, ensayos tales como ensayos de análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayos de análisis de secuencia, ensayos de análisis electroforético, ensayos de análisis de polimorfismo de longitud de restricción, ensayos de análisis de hibridación, hibridación específica de alelos, ligamiento de oligonucleótidos, ligamiento/elongación específicos de alelo, amplificación específica de alelo, extensión de una sola base, sonda de inversión molecular, escisión invasiva, terminación selectiva, polimorfismo de longitud de restricción, secuenciación, polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP), polimorfismo de cadena monocatenaria, escisión de emparejamiento erróneo y electroforesis en gel de gradiente de desnaturalización, todas las cuales pueden utilizarse solas o en combinación. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" incluye un polinucleótido tal como una molécula de ADN o ARN monocatenario o

bicatenario, incluyendo, por ejemplo, ADN genómico, ADNc y ARNm. Esta expresión abarca moléculas de ácido nucleico de origen tanto natural como sintético, así como moléculas de configuración lineal, circular o ramificada que representa la cadena con sentido o antisentido, o ambas, de una molécula de ácido nucleico nativa. Se entiende que dichos ácidos nucleicos pueden estar sin purificar, purificados o unidos, por ejemplo, a un material sintético tal como una perla o matriz de columnas.

En aspectos particulares, la presencia o ausencia de un alelo variante (por ejemplo, mutación somática) en uno o más genes tales como oncogenes y/o genes supresores tumorales se determina utilizando un ensayo de genotipado como se ha descrito en el documento WO2013/026027, que reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/525.137, presentada el 18 de agosto de 2011 y la solicitud provisional de los Estados Unidos n.º 61/588.151, presentada el 18 de enero de 2012.

Se obtiene rutinariamente de individuos material que contiene ácido nucleico. Dicho material es cualquier materia biológica a partir de la que pueda prepararse ácido nucleico. Como ejemplos no limitantes, el material puede ser sangre completa, suero, plasma, saliva, hisopo de mejilla, esputo u otro líquido corporal o tejido que contenga ácido nucleico. En un aspecto, un método de la presente divulgación se practica con sangre completa, que puede obtenerse fácilmente por medios no invasivos y usarse para preparar ADN genómico. En otro aspecto, el genotipado implica la amplificación del ácido nucleico de un individuo utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El uso de PCR para la amplificación de ácidos nucleicos es bien conocido en la técnica (véase, por ejemplo, Mullis *et al.* (Eds.), *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhäuser, Boston, (1994)). En otro aspecto más, se realiza amplificación por PCR utilizando uno o más cebadores marcados con fluorescencia. En un aspecto adicional, se realiza amplificación por PCR utilizando uno o más cebadores marcados o sin marcar que contienen un agente de unión del surco menor de ADN.

Se puede usar cualquiera de una diversidad de cebadores diferentes para amplificar el ácido nucleico de un individuo mediante PCR con el fin de determinar la presencia o ausencia de un alelo variante (por ejemplo, mutación somática) en un método de la divulgación. Como lo entiende un experto en la materia, se pueden diseñar cebadores para análisis de PCR basándose en la secuencia que flanquea el (los) sitio(s) polimórfico(s) de interés en el gen de interés. Como un ejemplo no limitante, un cebador de secuencia puede contener de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de una secuencia cadena arriba o cadena abajo del sitio polimórfico de interés en el gen de interés. Dichos cebadores están diseñados en general para tener un contenido suficiente de guanina y citosina para alcanzar una alta temperatura de fusión que permita una etapa de hibridación estable en la reacción de amplificación. Varios programas informáticos, tales como Primer Select, están disponibles para ayudar en el diseño de cebadores de PCR.

Un ensayo de discriminación alélica Taqman® disponible de Applied Biosystems puede ser útil para genotipar a un individuo en un sitio polimórfico para determinar de este modo la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés. En un ensayo de discriminación alélica Taqman®, se construye una sonda específica marcada con colorante fluorescente para cada alelo. Las sondas contienen diferentes colorantes indicadores fluorescentes tales como FAM y VIC™ para diferenciar la amplificación de cada alelo. Además, cada sonda tiene un colorante interruptor en un extremo que interrumpe la fluorescencia por transferencia de energía por resonancia de fluorescencia. Durante la PCR, cada sonda se hibrida específicamente con secuencias complementarias en el ácido nucleico del individuo. La actividad nucleasa 5' de la Taq polimerasa se usa para escindir solamente la sonda que hibrida con el alelo. La escisión separa el colorante indicador del colorante interruptor, dando como resultado aumento de la fluorescencia por el colorante indicador. Por tanto, la señal de fluorescencia generada por amplificación por PCR indica qué alelos están presentes en la muestra. Los emparejamientos erróneos entre una sonda y un alelo reducen la eficacia tanto de hibridación como de escisión de sonda por la Taq polimerasa, dando como resultado poca o ninguna señal fluorescente. Los expertos en la materia entienden que se puede lograr especificidad mejorada en ensayos de discriminación alélica conjugando un grupo de agente de unión al surco menor (MGB) de ADN con una sonda de ADN como se describe, por ejemplo, en Kutayin *et al.*, *Nuc. Acids Research* 28:655-661 (2000). Los agentes de unión a surco menor incluyen, pero sin limitación, compuestos tales como el tripéptido de dihidrociclopirroloindol (DPI3).

El análisis de secuencia también puede ser útil para el genotipado de un individuo según los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés. Como conocen los expertos en la materia, un alelo variante de interés puede detectarse mediante análisis de secuencia usando los cebadores apropiados, que se diseñan basándose en la secuencia que flanquea el sitio polimórfico de interés en el gen de interés. Por ejemplo, un alelo variante en un gen de interés puede detectarse mediante análisis de secuencia usando cebadores diseñados por un experto en la materia. Los cebadores de secuencia adicionales o alternativos pueden contener de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de una secuencia que corresponde a una secuencia de aproximadamente 40 a aproximadamente 400 pares de bases cadena arriba o cadena abajo del sitio polimórfico de interés en el gen de interés. Dichos cebadores están diseñados en general para tener un contenido suficiente de guanina y citosina para alcanzar una alta temperatura de fusión que permita una etapa de hibridación estable en la reacción de secuenciación.

La expresión "análisis de secuencia" incluye cualquier proceso manual o automático mediante el cual se determina el orden de los nucleótidos en un ácido nucleico. Como ejemplo, puede usarse análisis de secuencia para determinar la

secuencia de nucleótidos de una muestra de ADN. La expresión análisis de secuencia abarca, sin limitación, métodos químicos y enzimáticos tales como métodos dideoxi enzimáticos, incluyendo, por ejemplo, secuenciación de Maxam-Gilbert y Sanger, así como variaciones de los mismos. La expresión análisis de secuencia abarca además, pero sin limitación, secuenciación de ADN por matriz capilar, que se basa en la electroforesis capilar y detección de fluorescencia inducida por láser y puede realizarse utilizando instrumentos tales como MegaBACE 1000 o ABI 3700. Como ejemplos adicionales no limitantes, la expresión análisis de secuencia abarca la secuenciación por termociclado (véase, Sears *et al.*, *Biotechniques* 13:626-633 (1992)); secuenciación en fase sólida (véase, Zimmerman *et al.*, *Methods Mol. Cell Biol.* 3:39-42 (1992); y secuenciación con espectrometría de masas, tal como la espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (véase, MALDI-TOF MS; Fu *et al.*, *Nature Biotech.* 16:381-384 (1998)). La expresión análisis de secuencia incluye además, pero sin limitación, secuenciación por hibridación (SBH), que se basa en una matriz de todos los oligonucleótidos cortos posibles para identificar un segmento de secuencia (véase, Chee *et al.*, *Science* 274:610-614 (1996); Drmanac *et al.*, *Science* 260:1649-1652 (1993); y Drmanac *et al.*, *Nature Biotech.* 16:54-58 (1998)). Un experto en la materia entiende que estas y variaciones adicionales están abarcadas por la expresión análisis de secuencia como se define en el presente documento.

El análisis electroforético también puede ser útil en el genotipado de un individuo según los métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés. El "análisis electroforético" como se usa en el presente documento en referencia a uno o más ácidos nucleicos tales como fragmentos amplificados incluye un proceso por el que se mueven moléculas con carga a través de un medio estacionario bajo la influencia de un campo eléctrico. La migración electroforética separa los ácidos nucleicos principalmente en función de su carga, que está en proporción a su tamaño, migrando moléculas más pequeñas más rápidamente. La expresión análisis electroforético incluye, sin limitación, análisis usando electroforesis en gel en bloque, tal como electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida o electroforesis capilar. Se produce análisis electroforético capilar en general dentro de un capilar de cuarzo de diámetro pequeño (50-100 m) en presencia de altas tensiones de separación (nivel de kilovoltios) con tiempos de separación de varios minutos. Utilizando análisis electroforético capilar, los ácidos nucleicos se detectan convenientemente mediante absorción UV o marcaje fluorescente y la resolución de una sola base se puede obtener en fragmentos de hasta varios cientos de pares de bases. Dichos métodos de análisis electroforético, y variaciones de los mismos, se conocen bien en la técnica, como se describe, por ejemplo, en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* Capítulo 2 (Suplemento 45) John Wiley & Sons, Inc. Nueva York (1999).

El análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) también puede ser útil para genotipar a un individuo según los métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés (véase, Jarcho *et al.*, *en* Dracopoli *et al.*, *Current Protocols in Human Genetics* páginas 2.7.1-2.7.5, John Wiley & Sons, Nueva York; Innis *et al.*, (Ed.), *PCR Protocols*, San Diego: Academic Press, Inc. (1990)). Como se usa en el presente documento, el "análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción" incluye cualquier método para distinguir alelos polimórficos utilizando una enzima de restricción, que es una endonucleasa que cataliza la degradación de ácido nucleico después del reconocimiento de una secuencia de bases específica, en general un palíndromo o repetición invertida. Un experto en la técnica entiende que el uso de análisis de RFLP depende de una enzima que puede diferenciar un alelo variante de un tipo silvestre u otro alelo en un sitio polimórfico.

Además, la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo puede ser útil para el genotipado de un individuo en los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés. La hibridación de oligonucleótidos específica de alelo se basa en el uso de una sonda oligonucleotídica marcada que tiene una secuencia perfectamente complementaria, por ejemplo, de la secuencia que abarca el alelo variante. En condiciones adecuadas, la sonda específica de alelo variante se hibrida con un ácido nucleico que contiene el alelo variante pero no se hibrida con uno o más alelos, que tienen uno o más emparejamientos erróneos de nucleótidos en comparación con la sonda. Si se desea, también se puede usar una segunda sonda oligonucleotídica específica de alelo que coincida con un alelo alternativo (por ejemplo, de tipo silvestre). De forma similar, la técnica de amplificación de oligonucleótidos específica de alelo se puede utilizar para amplificar selectivamente, por ejemplo, un alelo variante mediante el uso de un cebador oligonucleotídico específico de alelo que es perfectamente complementario de la secuencia de nucleótidos del alelo variante pero que tiene uno o más emparejamientos erróneos en comparación con otros alelos (Mullis *et al.*, mencionado anteriormente). Un experto en la materia entiende que el o los emparejamientos erróneos de nucleótidos que distinguen entre el alelo variante y otros alelos se localizan con frecuencia en el centro de un cebador oligonucleotídico específico de alelo para usar en la hibridación de oligonucleótidos específica de alelo. Por el contrario, un cebador oligonucleotídico específico de alelo que se va a utilizar en la amplificación por PCR contiene en general uno o más emparejamientos erróneos de nucleótidos que distinguen entre la variante y otros alelos en el extremo 3' del cebador.

Un ensayo de movilidad de heterodúplex (HMA) es otro ensayo bien conocido que se puede utilizar para el genotipado en los métodos de la presente divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés. El HMA es útil para detectar la presencia de un alelo variante, ya que un dúplex de ADN que porta un emparejamiento erróneo tiene movilidad reducida en un gel de poliacrilamida en comparación con la movilidad de un dúplex con pares de bases perfectamente formados (véase,

Delwart *et al.*, Science, 262:1257-1261 (1993); White *et al.*, Genomics, 12:301-306 (1992)).

La técnica de polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP) también puede ser útil para el genotipado en los métodos descritos en el presente documento para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés (véase, Hayashi, Methods Applic., 1:34-38 (1991)). Esta técnica se utiliza para detectar alelos variantes basándose en las diferencias en la estructura secundaria de ADN monocatenario que producen una movilidad electroforética alterada en la electroforesis en gel no desnaturizante. Los alelos variantes se detectan mediante comparación del patrón electroforético del fragmento de ensayo con fragmentos convencionales correspondientes que contienen alelos conocidos.

La electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE) también puede ser útil en los métodos de la divulgación para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante particular (por ejemplo, mutación somática) o haplotipo en el gen de interés. En DGGE, se somete a electroforesis ADN bicatenario en un gel que contiene una concentración creciente de desnaturizante; los fragmentos bicatenarios compuestos de alelos con emparejamiento erróneo tienen segmentos que se funden más rápidamente, provocando que dichos fragmentos migren de manera diferente en comparación con secuencias perfectamente complementarias (véase, Sheffield *et al.*, "Identifying DNA Polymorphisms by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" en Innis *et al.*, mencionado anteriormente, 1990).

Otros métodos moleculares útiles para el genotipado de un individuo son conocidos en la técnica y útiles en los métodos de la presente divulgación. Dichos enfoques de genotipado bien conocidos incluyen, sin limitación, secuenciación automática y técnicas de emparejamiento erróneo de RNasa (véase, Winter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:7575-7579 (1985)). Asimismo, un experto en la materia entenderá que, cuando se vaya a determinar la presencia o ausencia de múltiples alelos variantes, pueden detectarse alelos variantes individuales mediante cualquier combinación de métodos moleculares. Véase, en general, Birren *et al.* (Eds.) Genome Analysis: A Laboratory Manual Volumen 1 (Analyzing DNA) Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1997). Además, un experto en la materia entiende que pueden detectarse múltiples alelos variantes en reacciones individuales o en una única reacción (un ensayo "múltiple").

VII. Producción de anticuerpos

La generación y selección de anticuerpos que aún no están disponibles en el mercado para analizar los niveles de expresión y activación de moléculas de transducción de señal en células tumorales de acuerdo con los inmunoensayos de la presente divulgación se pueden realizar de varias maneras. Por ejemplo, una manera es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, antígeno) utilizando métodos de expresión y purificación de proteínas conocidos en la técnica, mientras que otra manera es sintetizar el polipéptido de interés usando métodos de síntesis de péptidos en fase sólida conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol. 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol. 289 (1997); Kiso *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 38:1192-99 (1990); Mostafavi *et al.*, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1:255-60, (1995); y Fujiwara *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 44:1326-31 (1996). Después, el polipéptido purificado o sintetizado se puede inyectar, por ejemplo, en ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Un experto en la materia reconocerá que hay muchos procedimientos disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1988). Un experto en la materia también apreciará que los fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan (por ejemplo, conservan las regiones de unión funcional de) anticuerpos también pueden prepararse a partir de información genética mediante diversos procedimientos. Véase, por ejemplo, Antibody Engineering: A Practical Approach, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); y Huse *et al.*, J. Immunol., 149:3914-3920 (1992).

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

Una descripción más detallada de anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de los mismos y métodos de purificación de anticuerpos se encuentra en la publicación de PCT N.º WO 2010/132723.

Un experto en la materia apreciará que cualquier molécula de unión que tenga una función similar a un anticuerpo, por ejemplo, una molécula de unión o compañero de unión que es específico para uno o más analitos de interés en una muestra, también se puede utilizar en los métodos de la presente divulgación. Los ejemplos de moléculas de tipo anticuerpo adecuadas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de dominio, unicuerpos, nanocuerpos, proteínas reactivas a antígeno de tiburón, avímeros, adnectinas, anticalinas, ligandos de afinidad, filómeros, aptámeros, aficuerpos, trinectinas y similares.

VIII. Métodos de administración

Según los métodos de la presente divulgación, los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento se

administran a un sujeto por cualquier medio conveniente conocido en la técnica. Los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para predecir la eficacia terapéutica de un fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos en un sujeto que tiene un tumor de pulmón. Los métodos de la presente divulgación también pueden utilizarse para predecir la respuesta de un tumor de pulmón al tratamiento con un fármaco antineoplásico o una combinación de fármacos antineoplásicos. Los métodos de la divulgación también pueden usarse para seleccionar o identificar un fármaco antineoplásico adecuado o una combinación de fármacos antineoplásicos para el tratamiento de un tumor de pulmón. Un experto en la materia apreciará que uno o más fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento pueden administrarse solos o como parte de un enfoque terapéutico combinado con quimioterapia convencional, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y/o cirugía.

En determinados aspectos, el fármaco antineoplásico comprende un agente anti-señalización (es decir, un fármaco citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa; un agente antiproliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna; y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular el crecimiento descontrolado de células aberrantes tales como células cancerosas. En algunos aspectos, el sujeto es tratado con uno o más agentes anti-señalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico. Se han descrito anteriormente anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes antiproliferativos, agentes quimioterapéuticos, agentes hormonales terapéuticos, agentes radioterapéuticos y vacunas ilustrativos.

En algunos aspectos, los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento pueden administrarse conjuntamente con agentes inmunoterapéuticos convencionales incluyendo, pero sin limitación, inmunoestimulantes (por ejemplo, bacilo Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, interferón alfa, etc.), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de *pseudomonas*, etc.) y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ^{111}In , ^{90}Y o ^{131}I , etc.).

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

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

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

Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar dichas formas de dosificación (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación normalmente incluyen un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de la permeación tisular, solubilizantes y similares. Los excipientes apropiados pueden adaptarse a la forma de dosificación particular y a la vía de administración por métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, mencionado anteriormente).

Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos tales como carbopoles, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite

mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil- y propil-hidroxi-benzoatos (es decir, los parabenos); agentes de ajuste del pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; y agentes saboríferos. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas poliméricas biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrina.

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

En algunos aspectos, la dosis terapéuticamente eficaz toma la forma de una píldora, comprimido o cápsula y, por tanto, la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco antineoplásico, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como un almidón, goma arábica, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de los mismos. Un fármaco antineoplásico también se puede formular en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

Las formas de dosificación líquidas se pueden preparar disolviendo o dispersando un fármaco antineoplásico y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, cloruro de sodio 0,9 % p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para administración oral, tópica o intravenosa. Un fármaco antineoplásico también puede formularse en un enema de retención.

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

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

Un sujeto también puede supervisarse en intervalos de tiempo periódicos para evaluar la eficacia de un determinado régimen terapéutico. Por ejemplo, los estados de activación de determinadas moléculas de transducción de señales pueden cambiar basándose en el efecto terapéutico del tratamiento con uno o más de los fármacos antineoplásicos descritos en el presente documento. El sujeto puede supervisarse para evaluar la respuesta y entender los efectos de determinados fármacos o tratamientos en un enfoque individualizado. Adicionalmente, los sujetos que inicialmente responden a un fármaco antineoplásico específico o una combinación de fármacos antineoplásicos pueden volverse refractarios al fármaco o la combinación de fármacos, lo que indica que estos sujetos han desarrollado resistencia a fármacos adquirida. Estos sujetos pueden interrumpir su terapia actual y se les puede recetar un tratamiento alternativo de acuerdo con los métodos de la presente invención.

IX. Ejemplo

El siguiente ejemplo se ofrece para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1. Identificaciones de sensibilidad a fármacos en el cáncer de pulmón no microcítico.

Este ejemplo describe el perfil de activación de la ruta de tirosina quinasa receptora y mutaciones genéticas en ocho líneas celulares tumorales de pulmón humano y 50 líneas tisulares tumorales de pulmón humano para definir rutas moleculares. Se utilizó un panel de ocho inhibidores de quinasa para determinar si el bloqueo de la activación de la ruta afectaba al crecimiento de células tumorales. Se descubrió que la ruta de HER1 en líneas celulares mutantes de HER1 HCC827 y H1975 estaba muy activada y era sensible a la inhibición de HER1. H1993 es una línea celular amplificada de c-MET que muestra la activación de la ruta de c-MET y HER1 y sensibilidad al tratamiento con inhibidores de c-MET. Las células H358 y A549 activadas por la ruta de IGF-1R son sensibles a la inhibición de IGF-1R. El inhibidor de PI3K corriente abajo, BEZ-235, inhibió eficazmente el crecimiento de células tumorales en la mayoría de las líneas celulares ensayadas, excepto las células H1993 y H1650, mientras que el inhibidor de MEK PD-325901 fue eficaz en el bloqueo del crecimiento de la línea celular mutada KRAS H1734, pero no H358, A549 y H460. El agrupamiento jerárquico de muestras tumorales primarias con las líneas celulares tumorales correspondientes

basadas en sus identificaciones de ruta reveló perfiles similares para activación de rutas de HER1, c-MET y IGF-1R y predice opciones de tratamiento potenciales para los tumores primarios basándose en la respuesta de líneas celulares tumorales al panel de inhibidores de quinasa.

- 5 La divulgación de Gong *et al.*, Int. J. Proteomics, Vol. 2011, artículo ID 215496 (2011) se cita por la presente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares tumorales de pulmón humano, muestras tisulares de cáncer de pulmón e inhibidores de quinasa:

- 10 Ocho líneas celulares de CPNM: HCC827, H1975, H1734, H1993, H358, H1650, A549 y H460 se seleccionaron y representan los principales subtipos de cáncer CPNM, adenocarcinoma y carcinoma de pulmón macrocítico. Las líneas celulares se obtuvieron de ATCC (Tabla 3). Se recogieron cincuenta muestras de adenocarcinoma de pulmón de
15 pacientes operados de cáncer de pulmón en la Universidad de Michigan. La recogida y el uso de todas las muestras tisulares fueron aprobadas por las Juntas de Revisión Institucional de Sujetos Humanos de la Universidad de Michigan. La información demográfica de los pacientes se muestra en la Tabla 4. Las muestras tumorales primarias se congelaron instantáneamente y se seccionaron con criostato para identificar regiones que representan >70 % de
20 celularidad tumoral para análisis de ruta posterior. Las muestras (tamaño de ~2 milímetros cúbicos) se enviaron a Prometheus Laboratories en hielo seco para su análisis. Se obtuvieron ocho inhibidores de quinasa que representan un panel diverso de terapias potenciales contra el cáncer de Selleck Chemicals (Houston, TX). La colección incluyó
25 inhibidores de RTK específicos así como múltiples, es decir, compuestos dirigidos a las rutas de quinasa celular: Inhibidores de Her1/2/4 (receptores del factor de crecimiento epidérmico) (Erlotinib para Her1, Lapatinib para Her1/2, Gefitinib para Her1/2/4 y BIBW-2992 es un inhibidor irreversible para Her1/2), inhibidor de c-Met (receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), PF-2341066, inhibidor de IGF-1R (receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1) BMS-536924, inhibidor de MEK (proteína quinasa quinasa activada por mitógeno), PD-325901 y PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) y mTOR (diana de rapamicina de mamífero) BEZ-235.

Tabla 3. Características clínicas de las ocho líneas celulares tumorales de pulmón.

Nombre	ATCC Cat. N.º	Tipo	Origen
HCC827	CRL-2868	Adenocarcinoma	Primario, epitelial pulmonar
H1975	CRL-5908	Adenocarcinoma	Primario, epitelial pulmonar
H1734	CRL-5891	Adenocarcinoma	Primario, epitelial pulmonar
H1993	CRL-5909	Adenocarcinoma	Metastásico, ganglio linfático
H358	CRL-5807	Carcinoma bronquioalveolar	Primario, epitelial pulmonar
H1650	CRL-5883	Carcinoma bronquioalveolar	Metastásico, derrame pleural
A549	CCL-185	Carcinoma macrocítico	Primario, epitelial pulmonar
H460	HTB-177	Carcinoma macrocítico	Metastásico, derrame pleural

30 Tabla 4. Características clínicas de 50 tumores pulmonares humanos.

Edad promedio de los pacientes (intervalo)	68.2 (51-90)
Sexo	
Mujer	24
Hombre	26
Estadio tumoral	
I	32
II	7
III-IV	11
Estado actual de los pacientes	
Muerto	23
Vivo	27

Preparación de lisados a partir de líneas celulares y muestras de tumores primarios:

- 35 Se cultivaron células tumorales en su medio de cultivo respectivo recomendado por la ATCC más suero bovino fetal (FBS) al 10 %. Las células se cultivaron en placas de cultivo celular de 6 pocillos de 35 mm hasta alcanzar 80 % de confluencia. Después de lavar las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 3 veces, la placa de cultivo celular se colocó en hielo y después la placa se inclinó con cuidado sobre su lado durante 10 segundos para retirar por completo todos los medios residuales. Después, se añadieron 150 µl de tampón de lisis helado a cada placa y la
40 placa se dejó en hielo durante 5 min. Las células lisadas se rasparon y, junto con el lisado en bruto, se transfirieron a un tubo de centrifuga de 1,5 ml. La mezcla se agitó vorticialmente en el tubo, se colocó en hielo durante 15 minutos y después se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 ° C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de centrifuga y se almacenó a -70 °C hasta su análisis. Las muestras de tumores congeladas se procesaron de manera similar mediante la adición de 4 volúmenes de tampón de lisis helado por volumen de tejido y se homogeneizaron en un

homogeneizador de alto rendimiento Powergren (Fisher Scientific) a un ajuste de velocidad de 7 durante 2 minutos. El homogeneizado se transfirió a un tubo de centrífuga de 1,5 ml y se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante del lisado tumoral se recogió y almacenó a -70 °C hasta su análisis.

5 Realización del perfil de las rutas de señalización utilizando el ensayo CEER™ en líneas celulares tumorales y muestras tisulares:

El principio del ensayo CEER™ se basa en la captura de la proteína diana por un anticuerpo específico de diana impreso en dos diluciones en la superficie de un portaobjetos de micromatrices. La medición del estado de activación de la proteína diana capturada se revela mediante la formación de un inmunocomplejo único, que requiere la localización conjunta de dos anticuerpos de detección conjugados con enzimas en la misma proteína diana capturada en la superficie de micromatrices como se ilustra en la Figura 7. La formación de este complejo se inicia por la unión del primer anticuerpo de detección, que se acopla a glucosa oxidasa (GO), a un epítipo en la proteína diana capturada que es diferente del epítipo reconocido por el anticuerpo de captura, seguido de la unión de un segundo anticuerpo de detección, que se acopla a peroxidasa de rábano picante (HRP), con un resto de tirosina fosforilado (p-Tyr) en la proteína diana. Tras la adición de glucosa, la GO inmovilizada en la proteína diana capturada produce H₂O₂ y debido a la proximidad estrecha, el H₂O₂ generado localmente es utilizado después por la HRP acoplada al segundo anticuerpo de detección específico de p-Tyr para generar una señal química que puede amplificarse con biotil-tiramida. La sensibilidad y especificidad para la detección de la proteína diana fosforilada es potenciada en gran medida por este proceso de amplificación y reacción colaborativo, que está mediado por la unión simultánea de tres anticuerpos diferentes en la misma proteína diana.

Inhibición de rutas de señalización activadas en líneas de células tumorales por inhibidores de quinasa:

25 Las células tumorales se cultivaron en su medio de cultivo respectivo con FBS al 10 % en placas de cultivo celular de 6 pocillos de 35 mm hasta que alcanzaron una confluencia de ~80 %. Las células se privaron de alimento durante una noche en medio sin suero, seguido de un tratamiento de 4 horas con diversas concentraciones del inhibidor de quinasa. A continuación, se prepararon lisados celulares a partir de las células tratadas como antes y alícuotas de los lisados se sometieron al ensayo CEER™.

30 Inhibición del crecimiento de línea celular tumoral por inhibidores de quinasa:

Las células tumorales se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas. Después del lavado, las células cultivadas se incubaron en su medio respectivo que contenía FBS al 5 % y diversas concentraciones del inhibidor indicado durante 48 h. Se realizó determinación de la inhibición del crecimiento de células tumorales mediante la adición de 100 µl del tampón Cell Titer-Glo® y reactivo de marcaje de sustrato Cell Titer-Glo® (Promega) combinados a cada pocillo de las placas, seguido de incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la luminiscencia. La señal luminiscente de las muestras celulares se detectó utilizando un lector de placas de microtitulación M5. Para estudios que implican el tratamiento con más de un inhibidor, el inhibidor seleccionado que mostró más de 25 % de inhibición del crecimiento de células tumorales a una concentración 10 µM cuando se trató individualmente se ensayó adicionalmente en tratamiento de combinación con otro inhibidor. Se combinó una concentración 5 µM de cada inhibidor para obtener una dosis 10 µM y se realizó la misma dilución semilogarítmica que en el tratamiento con un solo fármaco para añadir a las células. Las células tumorales se trataron durante 48 horas y se midió la viabilidad celular como en el tratamiento con un solo inhibidor.

45 Inhibición independiente del anclaje de crecimiento de líneas celulares tumorales por inhibidores de quinasa:

Se añadió una suspensión celular individual de 3000 células de cada una de las ocho líneas celulares tumorales en una mezcla de 1 ml de agarosa al 1,2 % (Seaplaque; FMC, Rockland, ME) en DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA) más FBS al 10 % sobre agarosa blanda al 1 % que se había permitido que gelificara previamente en los pocillos de una placa de cultivo celular de 6 pocillos de 35 mm. Las placas se mantuvieron a 4 °C durante 2 h para solidificar la capa que contiene células. Las placas se incubaron después a 37 °C en una incubadora de CO₂ con 2 ml de medio que contenía diversas concentraciones del inhibidor de quinasa. El medio con el inhibidor se cambió cada 3 días. Después de 2 semanas, se puntuaron colonias de células mayores de 10 células bajo un microscopio de fase invertida Nikon [Gong *et al.*, Cancer Res., 59(24):6239-45 (1999)].

Genotipado de muestras tisulares tumorales de pulmón:

Se aisló ADN genómico de muestras tisulares tumorales humanas utilizando el kit DNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Los cebadores y las sondas para todos los SNP medidos se obtuvieron del ensayo de genotipado de SNP ABI TaqMan® (Applied Biosystems), utilizando el servicio Assay-by-Design para el cual se proporcionaron las secuencias o el servicio Assay-on-Demand cuando los ensayos ya estaban diseñados por Applied Biosystems. Se realizaron reacciones en un volumen de 5 µl y contenían 10 ng de ADN, mezcla maestra TaqMan Universal 1x (Applied Biosystems), 200 nM de cada sonda y 900 nM de cada cebador. Las condiciones de ciclado en el sistema de detección de secuencias ABI PRISM® 7900HT (Applied Biosystems) fueron 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Después del ciclado, se midió la fluorescencia del punto final y se determinaron

las secuencias amplificadas mediante análisis de secuenciación de ADN. Los alelos se asignaron utilizando el software SDS 2.1 (Applied Biosystems).

Análisis de agrupamiento de muestras tisulares tumorales de pulmón y generación de mapas de calor:

Se realizó análisis de agrupamiento jerárquico en las 50 muestras tisulares tumorales de pulmón para explorar si los perfiles de activación de ruta determinados por el ensayo CEER™ y el análisis mutacional del gen realizado para estas muestras podría segregarlos en subconjuntos distintos que son similares a la activación de ruta e identificaciones mutacionales de las líneas celulares tumorales. La construcción general de una clasificación jerárquica aglomerada se realizó mediante el uso de un algoritmo para encontrar los dos objetos más cercanos y fusionarlos en un grupo y después encontrar y fusionar los siguientes dos puntos más cercanos, donde un punto es un objeto individual o un grupo de objetos. Se generó un mapa de calor del resultado de agrupamiento jerárquico unidimensional en el análisis para demostrar la estructura de agrupamiento de muestras basándose en identificaciones de activación de ruta y el estado mutacional.

Procedimiento de ensayo CEER™ para realización del perfil de rutas de señalización en líneas de células tumorales:

El ensayo se realizó imprimiendo 500 pl de un anticuerpo de captura disponible en el mercado por mancha a dos concentraciones de dilución de 0,5 y 1,0 mg/ml por triplicado para producir seis manchas por fila para cada anticuerpo de captura en un portaobjetos de vidrio recubierto con nitrocelulosa de 3X2 cm (FAST®, Whatman) utilizando una impresora Nano-Plotter NP2.1 (GeSIM mbH, Alemania) como se ilustra en la Figura 8, panel superior. Los anticuerpos de captura contra IgG de ratón, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 (Her1), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (Her2), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3 (Her3), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos humanos (cMET), receptor del factor de crecimiento de tipo insulina humana 1 (IGF1R), receptor del factor de crecimiento de células madre humanas (cKit), fosfatidilinositol-3-quinasa humana (PI3K), proteína que contiene el dominio de homología 2 de Src humana (SHC) y citoqueratina humana (CK), se imprimieron en este orden en 10 filas de arriba a abajo en cada portaobjetos. En el ensayo de las muestras tisulares tumorales, se omitió la impresión del anticuerpo de captura contra cKit porque no se observó activación de esta ruta de señalización en ninguna de las líneas celulares de cáncer de pulmón. El anti-IgG de ratón impreso en la primera fila se usó como un control negativo, mientras que el anticuerpo de captura de pan-citoqueratina impreso en la última fila se usó como control positivo. Después de imprimir, los portaobjetos se enjuagaron 2 veces con TBST (Tris 50 mM/NaCl 150 mM/Tween-20 0,1 %, pH 7,2-7,4), se bloquearon con 80 µl de tampón de bloqueo Whatman (Whatman) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) y después se lavó 2 veces con TBST. Para medición de las rutas activadas en las líneas celulares de pulmón, se añadieron lisados celulares diluidos en serie en 80 µl de tampón de reacción (albúmina de suero bovino (BSA) al 2 %/Triton X-100 al 0,1 %/TBS [TBST sin Tween-20], pH 7,2-7,4) a los portaobjetos según el número de lisados de células que se ensayan como se ilustra en la Figura 8, panel izquierdo, y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron 4 veces con TBST, 3 min cada vez. Después se añadió una combinación de cada par de anticuerpos de detección disponibles en el mercado respectivos para cada una de las quinasas diana, uno conjugado con GO y el otro con HRP, en 80 µl del tampón de reacción seguido de incubación durante 2 horas a TA. Los conjugados de anticuerpos de detección no unidos se retiraron lavando con TBST. Después, se añadieron 80 µl de la solución de generación y amplificación de señal (5 µg/ml de biotiniil tiramida [Perkin Elmer Life Sciences] en glucosa 50 mM en PBS) a cada portaobjetos y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad. Los portaobjetos se lavaron después con TBST 4 veces, 3 min cada vez. La deposición local de la señal de biotina-tiramida generada se reveló tras la adición de un reactivo de detección de señal, Alexa647 marcado con estreptavidina (Invitrogen) en PBS a 0,5 µg/ml (dilución 1:4000) en BSA al 2 %/ Triton al 0,1 %/TBS e incubado durante 40 min. Al término de la incubación, los portaobjetos se lavaron 4 veces con TBST, se secaron y se mantuvieron en la oscuridad hasta la exploración en el explorador de micromatrices. Cada portaobjetos se exploró en tres configuraciones de ganancia fotomultiplicadora para aumentar el rango dinámico efectivo. Las intensidades de señal de fondo corregidas se promediaron para puntos repetidos impresos por triplicado. El valor de fluorescencia relativa del blanco de reactivo respectivo se restó de cada muestra para obtener una unidad relativa de fluorescencia (URF) según el número de extractos de células. Las URF calculadas con el número correspondiente de extractos de células se utilizaron para generar las curvas de activación de la ruta de respuesta a dosis para cada línea celular.

Procedimiento de ensayo CEER™ para realizar el perfil de rutas de señalización en muestras de tejido tumoral:

Para comparación de los niveles relativos de activación de ruta de señalización dentro de las 50 muestras de tejido tumoral y las ocho líneas celulares tumorales, se utilizó una mezcla de tres líneas celulares, BT474, T47D y HCC827, como un patrón para generar las curvas de respuesta a dosis para cada una de las rutas activadas perfiladas por el ensayo CEER™. BT474 es una línea celular de cáncer de mama de ATCC (Cat. N.º HTB-20) que presenta una ruta de Her2 fuertemente activada. T47D es otra línea celular de cáncer de mama de ATCC (Cat. N.º HTB-133) que mostró las rutas de Her3 e IGF1R activadas de forma robusta mientras que, HCC827, una línea celular tumoral de pulmón empleada en el presente estudio se seleccionó porque mostraba una ruta de Her1 y cMET muy activada. Para generar las curvas patrón, se combinaron lisados correspondientes a 300 células BT474, que se habían pretratado con Heregulina 10 nM durante 15 minutos, 1000 células T47D, que se habían pretratado con IGF-1 100 ng/ml durante 15 minutos y 1000 células HCC827, que se habían pretratado con EGF 100 nM durante 15 minutos, para proporcionar la concentración de lisado celular convencional de partida, que después se diluyó en serie para producir un total de seis

concentraciones basadas en el número original de células empleadas para producir el lisado. Cada una de las concentraciones de lisado celular original y diluido, según la disminución de los números de células, se añadió a los seis portaobjetos preimpresos de anticuerpo de captura en las dos filas superior e inferior del panel con una concentración de lisado por portaobjetos, como se ilustra en la Figura 8, panel derecho. Combinando estos tres lisados celulares, se generaron señales para abarcar la mayoría de las rutas activadas detectadas en las líneas celulares tumorales. Cada dos filas posteriores de portaobjetos en el centro del panel se cargaron con extractos de las muestras de tejido tumoral o líneas celulares tumorales correspondiendo la fila superior a 10 µg y correspondiendo la fila inferior a 1 µg de concentración de proteína y una muestra por columna. Después de cargar los portaobjetos en cada panel, se sometieron al ensayo CEER™ como se ha descrito anteriormente y los datos generados a partir de los patrones de lisado se ajustaron a una ecuación de cinco parámetros mediante regresión no lineal, ajustando simultáneamente dos diluciones del anticuerpo de captura, para generar las curvas patrón para cada ruta. La unidad celular (UC) computada individual para las muestras tisulares tumorales o líneas celulares en cada ruta se determinó a partir de las curvas patrón.

Método para la preparación del conjugado de anticuerpo/GO y el conjugado de anti-p-Tyr/HRP:

El conjugado de anticuerpo/enzima se unió a través de una molécula de dextrano con grupos sulfhidrilo libres incorporados. El dextrano con sulfhidrilo incorporado se preparó convirtiendo primero algunos de los grupos hidroxilo en una molécula de dextrano de 500 KDa en grupos de carboximetil éter a través de reacción con ácido bromoacético en una solución de hidróxido de sodio. La agrupación de carboximetilo incorporado se acopló después al grupo amino funcional de cisteamina (HSCH₂CH₂NH₂) a través de carbodiimida soluble en agua para producir el dextrano con sulfhidrilo incorporado. Para conjugar el anticuerpo y la enzima respectivos con el dextrano con sulfhidrilo incorporado, el anticuerpo o la enzima se activó por primera vez mediante acoplamiento de los grupos funcionales amino libres en el anticuerpo o enzima con un reticulador bifuncional, succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce) según las instrucciones del fabricante. Usando una relación molar 1:5 de anticuerpo con respecto a enzima, el anticuerpo y la enzima con maleimidometilo incorporado resultantes se hacen reaccionar después simultáneamente con el dextrano con sulfhidrilo incorporado para formar el conjugado de anticuerpo-enzima, que después se purificó por cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño.

RESULTADOS

Realización del perfil de las rutas de quinasa activada en líneas celulares tumorales:

Las rutas de señalización celular activadas para ocho líneas celulares tumorales de pulmón se perfilaron utilizando el ensayo CEER™. El ensayo midió los niveles de Her1 (p-Tyr) activado, Her2, Her3, c-Met, IGF-1R, c-Kit, PI3K y SHC en las células basándose en el número de células que se ensayan. Las células tumorales se cultivaron en presencia de FBS al 10 % y se recogieron a aproximadamente 80 % de confluencia para la preparación de lisados celulares y el perfil de la ruta de señalización. Se ensayaron diluciones en serie de lisados de células tumorales equivalentes a 10 - 10.000 células y los datos sin procesar capturados en los portaobjetos se muestran en la Figura 1A y un gráfico representativo de los datos se muestra en la Figura 1B. Como se ve en la Figura 1B, las curvas de respuesta a dosis que representan el nivel de activación en cada ruta de RTK son inversamente proporcionales al número de células que se ensayan. Cuanto más activada esté la ruta, menor cantidad de células será necesaria para generar la señal máxima. Por tanto, la activación relativa de las rutas activadas se puede determinar basándose en el valor de CE₅₀ del número de células que se ensayan en cada curva de activación de ruta (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de activación relativos de las rutas de RTK determinados por el ensayo CEER™ en las ocho líneas celulares tumorales de pulmón expresadas como valores de CE₅₀ basados en el número de lisados de células que se ensayan.

Línea celular	Her1	Her2	Her3	c-Met	IGF-1R	PI3K	SHC
HCC827	21	353	19.203	108	6.961	6.254	
H1975		1.390		1.760			4670
H1734	3.996						
H1993		167	31.202	<10			408
H358	4.383	5.108		547074	10.3267		
H1650	3.214	1.705					
A549	1.234	6.169		2.950	1.730		
H460					206.648		

Como se muestra en la Figura 1B, cada una de las ocho líneas celulares tumorales mostró un patrón de activación de RTK distinto. La línea celular de adenocarcinoma de pulmón, HCC827, mostró el mayor número de rutas de RTK activadas, estando Her1, c-Met y Her2 muy activados, estando PI3K moderadamente activado y estando tanto Her3 como IGF-1R poco activados. La otra línea celular de adenocarcinoma H1975 mostró solamente activación moderada de rutas de Her2, c-Met y SHC y una baja activación de la ruta de IGF-1R. La línea celular de adenocarcinoma restante

H1734 mostró una activación moderada de la ruta de Her1 y una activación muy baja de las rutas de Her2 y c-Met. Por el contrario, la línea celular de adenocarcinoma H1993 de un tumor metastásico mostró una activación muy potente de la ruta de c-Met, también con una alta activación de las rutas de Her2 y SHC y una activación moderada de las rutas de Her3 y Her1. Las líneas celulares H358 y H1650 de carcinoma bronquioalveolar tanto primario como metastásico mostraron una activación moderada de las rutas de Her1 y Her2, con H358 también mostraron una activación moderada de las rutas c-Met e IGF-1R. La línea celular de carcinoma macrocítico A549 mostró una activación moderada de las rutas de Her1 e IGF-1R con una activación baja de las rutas de c-Met y Her2, mientras que la línea celular H460 de carcinoma macrocítico metastásico mostró solo una activación muy baja de la ruta de IGF-1R.

Inhibición de rutas de señalización activadas en líneas de células tumorales por inhibidores de quinasa:

El perfil de las ocho líneas celulares tumorales mostró que las rutas de Her1 y Her2 están altamente activadas en las células HCC827 y por tanto el tratamiento de estas células con un inhibidor irreversible de Her1/2 BIBW-2992 debería poder bloquear la activación de estas rutas. De hecho, los datos presentados en la Figura 2, mostraron que se observó una potente inhibición dependiente de dosis de las rutas de Her1 y Her2 en las células HCC827 mediante tratamiento con BIBW-2992. Otras líneas celulares activadas por ruta de Her1 y/o Her2, H1975 y H1650, tuvieron asimismo estas activaciones de ruta bloqueadas por el tratamiento con BIBW-2992. Lo que es notable es que la línea celular H1975 que alberga las mutaciones T790M y L858R en el gen de EGFR (información obtenida del sitio web del Instituto Sanger), que confieren resistencia a los inhibidores de EGFR quinasa, Gefitinib y Erlotinib, respondió al inhibidor irreversible de EGFR quinasa BIBW-2992. Otras dos líneas celulares adicionales activadas por ruta de Her1 y/o Her2, H358 y H1734, también tuvieron su activación bloqueada por los inhibidores de Her1/2 quinasa, Gefitinib y Lapatinib, respectivamente. En la línea celular amplificada por c-Met H1993, la activación de esta ruta fue bloqueada por el tratamiento con PF-2341066, un inhibidor de c-Met quinasa. El inhibidor de c-Met también inhibió la ruta de señalización de Her1 en esta línea celular, más probablemente debido a interferencias entre las rutas de Her1 y c-Met. El tratamiento con el inhibidor de quinasa IGF-1R BMS-536924 fue capaz de bloquear la ruta de IGF-1R activada mostrada por las líneas celulares A549 y H460.

Inhibición de la proliferación de líneas celulares tumorales por inhibidores de quinasa:

Ya que uno de los fines de este estudio fue correlacionar las rutas de RTK activadas y mutaciones génicas encontradas en las líneas celulares tumorales con los inhibidores de quinasa apropiados para determinar si el tratamiento con los inhibidores podría inhibir el crecimiento de estas células, las ocho líneas celulares tumorales se trataron con los inhibidores de quinasa seleccionados y los resultados se muestran en la Figura 3. Como se esperaba, la línea celular de adenocarcinoma de pulmón HCC827, que mostró rutas de Her1 y Her2 muy activadas, así como mutación de EGFR, respondió muy bien a los inhibidores de Her1, Erlotinib y Gefitinib. Además, otros dos inhibidores de Her1/2, Lapatinib y BIBW-2992, también fueron capaces de inhibir la proliferación de esta línea celular. Por el contrario, el inhibidor específico de c-Met PF-2341066 no fue capaz de inhibir la proliferación de esta línea celular incluso aunque mostró la ruta de C-Met activada. Por otra parte, la inhibición de la proliferación por BMS-536924, un inhibidor de IGF-1R, en las células HCC827 podría deberse a interferencias entre las rutas de c-Met y IGF-1R. La proliferación de otras dos líneas celulares de adenocarcinoma activadas por ruta de Her1 y Her2, H1734 y H1975, también fue inhibida por Erlotinib. Por otra parte, el inhibidor irreversible de quinasa Her1/2, BIBW-2992, también fue capaz de inhibir potentemente el crecimiento de la línea celular H1975, que albergaba las mutaciones T790M y L858R en el gen de EGFR y por tanto hace que las células sean resistentes al tratamiento con Gefitinib y Lapatinib. Además, el inhibidor de IGF-1R BMS-536924 también fue capaz de inhibir el crecimiento de esta línea celular. Con respecto a la línea celular de adenocarcinoma metastásico H1993, que mostró una ruta de c-Met potentemente activada, el inhibidor de c-Met PF-2341066 fue capaz de bloquear su proliferación muy eficazmente. Lo que es más, el inhibidor de MEK corriente abajo PD-325901 también fue capaz de bloquear la proliferación de las células H1993, mientras que el inhibidor irreversible de Her1/2 BIBW-2992 y el inhibidor de PI3K BEZ-235 fueron capaces de bloquear la proliferación de esta línea celular pero solo de manera débil. La proliferación de la línea celular de carcinoma H358, que mostró una activación moderada de las rutas de Her1, Her2 e IGF-1R, fue bloqueada débilmente por los inhibidores de Her1/2, Lapatinib y Gefitinib, pero el inhibidor de IGF-1R BMS-536924 fue capaz de inhibir su proliferación más eficazmente. Sorprendentemente, el crecimiento de la línea celular H358 no fue inhibido por el inhibidor de c-Met PF-2341066, a pesar de que mostró una ruta de c-Met moderadamente activada. El crecimiento de la línea celular de carcinoma metastásico H1650, que albergaba rutas de Her1 y Her2 moderadamente activadas, fue inhibido por el inhibidor irreversible de Her1/2 BIBW-2992. La proliferación de la línea celular de carcinoma macrocítico A549, que mostró rutas de Her1 e IGF-1R moderadamente activadas, fue inhibida por el inhibidor de PI3K BEZ-235 y por el inhibidor de IGF-1R BMS-536924 y débilmente por el inhibidor de MEK PD-325901. El crecimiento de la línea celular de carcinoma macrocítico metastásico H460, que albergaba la mutación del gen PIK3CA y una ruta activada de IGF-1R, fue inhibido por el inhibidor de PI3K BEZ-235 pero débilmente inhibido por el inhibidor de IGF-1R BMS-536924.

Inhibición del crecimiento independiente de anclaje de líneas celulares tumorales por inhibidores de quinasa:

Ya que el crecimiento independiente de anclaje es un sello distintivo de las células transformadas, los inventores querían asegurarse de que los inhibidores de quinasa que eran capaces de bloquear fuertemente la proliferación de células tumorales en cultivo tisular también fueran capaces de inhibir la proliferación de las mismas células tumorales

de manera independiente de anclaje. Como se observa en la Figura 4, Erlotinib, que inhibió el crecimiento de células HCC827 cultivadas en placas de cultivo celular dependientes de anclaje, también fue capaz de reducir el tamaño de las colonias celulares cultivadas en placas de agar de manera independiente de anclaje. De forma similar, también se observó reducción de la formación del tamaño de colonias celulares mediante el tratamiento con el inhibidor irreversible de Her1/2 BIBW-2992 en células H1975 y H1650 como se ve cuando estas células se cultivaron de manera dependiente de anclaje. La formación de colonias grandes de células H1993, cuya proliferación en cultivo tisular se bloqueó de manera potente mediante tratamiento con el inhibidor de quinasa c-Met PF-2341066, también fue inhibida por tratamiento con el mismo inhibidor. La proliferación del tamaño de colonias celulares en las células H1734 se bloqueó potentemente mediante tratamiento con el inhibidor de la MEK corriente abajo PD-325901 como se observó cuando estas células se cultivaron en cultivo celular. Análogamente, el inhibidor de quinasa IGF-1R BMS-536924 fue capaz de reducir la formación de tamaño de colonias celulares de forma dependiente de dosis en las células H358, A549 y H460.

Inhibición del crecimiento de línea celular tumoral mediante una combinación de dos inhibidores de quinasa:

Las células tumorales con frecuencia dependen de la señalización de múltiples rutas y, por tanto, el tratamiento de pacientes con un solo agente rara vez puede erradicar el crecimiento tumoral [Pao W. *et al.*, PLoS Med 2, (73) (2005)]. Una práctica clínica habitual es tratar a pacientes con terapias combinadas. Para identificar productos terapéuticos con efectos sinérgicos, los inventores seleccionaron cuatro líneas celulares tumorales de las ocho y las trataron con una combinación de dos inhibidores de quinasa, uno que inhibe la RTK apropiada y el otro que inhibe una ruta de señalización corriente abajo. Como se observa en la Figura 5, las células H1975, cuyo crecimiento fue moderadamente inhibido por el inhibidor de RTK Her1/2 BIBW-2992, pero solo débilmente inhibido por el inhibidor de MEK corriente abajo PD-325901 y el inhibidor de PI3K corriente abajo BEZ-235, respondieron de manera más eficaz a una combinación de BIBW-2992 con PD-325901 o BEZ-235 con casi 100 % de inhibición del crecimiento de esta línea celular a una concentración de 10 μ M, mientras que una combinación de los dos inhibidores corriente abajo, PD-325901 y BEZ-235, fue mucho menos eficaz. Análogamente, la combinación de PD-325901 o BEZ-235 con el inhibidor de c-Met PF-2341066 fue más eficaz para bloquear la proliferación de las células H1993, que mostraron una ruta de c-Met potentemente activada, que al tratar esta línea celular con el inhibidor de c-Met PF-2341066 solo. Resulta interesante que una combinación de ambos inhibidores de quinasa corriente abajo, PD-325901 y BEZ-235, fue la más eficaz para bloquear la proliferación de esta línea celular. En la línea celular bronquioalveolar H358, que mostró activación de Her1 y Her2, el tratamiento con el inhibidor de Her1 Erlotinib en combinación con uno de los dos inhibidores corriente abajo, PD-325901 o BEZ-235, mostró inhibición sinérgica de la proliferación celular. Una combinación de los dos inhibidores corriente abajo, PD-0325901 y BEZ-235, también fue muy eficaz. El mismo fenómeno se observó en la línea celular bronquioalveolar metastásica H1650 cuando se trató con el inhibidor irreversible de Her1/2 BIBW-2992 en combinación con uno del inhibidor corriente abajo BEZ-235 o una combinación de los dos inhibidores corriente abajo, PD-325901 y BEZ-235.

Agrupamiento de muestras tisulares tumorales con líneas celulares tumorales:

El perfil de las 50 muestras tisulares pulmonares humanas utilizando el ensayo CEER™ reveló rutas de señalización activadas definidas en cada una de las muestras tisulares como se muestra en el mapa de calor en la Figura 6A (véase también Tabla 6). Basándose en estos resultados, el agrupamiento unidimensional no supervisado de las 50 muestras tisulares de pulmón con las líneas celulares correspondientes H1993, H1975, HCC827, H1734, H1650, H358, H460 tumorales y A549, podría realizarse como se muestra en la Figura 6B porque existe un grado significativo de activación de ruta compartida entre las muestras tisulares de tumor primario y las líneas celulares tumorales. El agrupamiento de las muestras tisulares tumorales con sus líneas celulares correspondientes proporciona información potencial acerca de la terapia dirigida basándose en los resultados de tratamiento farmacológico obtenidos a partir de las líneas celulares tumorales.

Tabla 6. Perfil de rutas de señalización mediante el ensayo CEER™ y estado mutacional en muestras tumorales de pulmón y líneas celulares tumorales de pulmón. Los números en la tabla corresponden a las unidades celulares (UC) calculadas determinadas para cada muestra y cuanto mayor sea el número, más se activará la ruta. (TS=tipo silvestre, Mut=mutado y N/D=el estado no se puede determinar).

Muestras	Her1	Her2	Her3	cMet	IGF1R	PI3K	SHC	KRAS (G34A_G37T)	KRAS (A183T)	P53 (C726G_G818T)	STK11 (C109T_G595T)
LC1	15,8	1,5	46,5	1,5	12,1	10,8	9,5	TS	TS	TS	TS
LC2	20,6	1,3	102,9	0,9	12,1	29,5	8,9	TS	TS	TS	TS
LC3	1,9	0,3	10,1	0,2	0	0	1,5	TS	TS	Mut	TS
LC4	2,7	0,6	9	0	1,7	1,2	7,4	Mut	TS	TS	TS
LC5	0	1,7	1,6	0,5	2,6	5,5	1,5	TS	TS	TS	TS
LC6	13,9	2,2	28,8	2,6	11,7	4,6	13,8	TS	TS	Mut	TS
LC7	0	1,9	5	0,9	5,1	11,6	2	Mut	TS	TS	TS
LC8	23,7	1,1	39,5	2,6	20,5	20,9	17,1	TS	TS	TS	TS
LC9	0,7	0,4	7,1	0,4	1	1	6,3	TS	TS	TS	TS
LC10	14,9	1,4	58,2	0,3	1,3	0,8	2,2	TS	TS	Mut	TS
LC11	16,8	4,3	39,4	1,2	10,7	11,2	10,5	TS	TS	N/D	TS
LC12	43,6	1,1	67,5	0,6	18,2	11,4	22,9	TS	TS	TS	TS
LC13	20,6	0,7	42,7	0,5	14,3	20,4	6,9	TS	TS	Mut	TS
LC14	17,6	1,3	46,1	2,6	36,6	21,3	21,2	TS	TS	TS	TS
LC15	3,1	0,2	4	0,2	0,6	3,4	1,1	TS	Mut	TS	TS
LC16	18,2	0,8	38	1,5	26,8	18,6	3,9	Mut	TS	TS	TS
LC17	3,6	0,2	827	0,1	7,5	1,3	2,9	TS	TS	N/D	TS
LC18	9	1,1	11,8	0,8	10,2	18,5	6,2	TS	TS	TS	TS
LC19	7,5	2,2	324,8	2	4,9	22,6	52,3	TS	TS	TS	TS
LC20	9,5	1,4	41,1	0,3	2,1	0,8	1,7	Mut	TS	TS	TS
LC21	0	2,4	4,9	1,1	2,9	6,3	7,5	Mut	TS	TS	TS
LC22	0	0	0	0,6	0	0	0	TS	TS	TS	TS
LC23	22,6	0,4	251,3	0,1	5,8	24,9	4,9	Mut	N/D	Mut	TS
LC24	10,8	0,5	35,1	0,4	11	4,9	0,2	TS	TS	N/D	TS
LC25	26,7	2,9	47,6	2,3	19,1	33,3	28,3	TS	N/D	TS	MUT
LC26	13	1,3	31,6	1,1	16,2	26,6	15,7	TS	N/D	TS	TS
LC27	14,3	0,7	46,7	0,1	6,2	3,4	8,7	TS	TS	TS	TS
LC28	8,1	1,8	501,6	0,1	2,7	11,2	175,3	TS	N/D	TS	TS
LC29	16,4	0,2	535,7	0,4	0,5	0,4	1,3	TS	TS	Mut	TS
LC30	4,1	0,2	5,1	0	1,3	1,2	0	Mut	TS	TS	TS

(continuación)

Muestras	Her1	Her2	Her3	cMet	IGF1R	PI3K	SHC	KRAS (G34A, G37T)	KRAS (A183T)	P53 (C726G, G818T)	STK11 (C109T, G595T)
LC31	70	5,1	99,7	7,8	36,2	69,5	75,4	TS	N/D	Mut	TS
LC32	16,5	0,9	29,5	1,3	16,9	15,4	5,2	N/D	TS	Mut	TS
LC33	19,3	0,6	78,3	0,1	8,6	1,6	10,4	TS	TS	TS	TS
LC34	16,1	0,6	21,4	1,6	10,1	17,8	5,8	TS	TS	TS	TS
LC35	0	0,8	29,4	0,1	0	0	5,6	TS	TS	TS	TS
LC36	18,9	0,9	61,6	0,3	7,2	2,9	8,9	TS	TS	Mut	TS
LC37	9,3	0,8	25,9	0,7	5	0	11	TS	TS	TS	TS
LC38	0	1,6	12	1,3	8,1	16,1	3,4	TS	TS	TS	TS
LC39	11,8	2,7	31,1	0,7	9,9	14,8	3	TS	TS	TS	TS
LC40	27,7	2,4	49,8	2,1	16,1	12,3	25,4	N/D	N/D	N/D	TS
LC41	0	1,5	4,2	0,9	2,9	6,6	1,6	TS	TS	TS	TS
LC42	13,5	1,3	49	0	10	38,3	4,1	TS	N/D	TS	TS
LC43	19,3	2,1	26,4	1,4	13,5	23,7	10,7	TS	N/D	TS	TS
LC44	10,3	0,5	28,1	1,1	13,3	9,2	2,5	Mut	TS	TS	TS
LC45	128,7	13,4	239,1	3,2	20,4	81,4	96,2	Mut	TS	TS	TS
LC46	4,3	0,4	13,6	0,1	2,2	2,4	1,2	TS	TS	TS	TS
LC47	26,5	2,6	83,6	0,9	31,6	68,4	21,2	TS	TS	TS	TS
LC48	0	0,1	4,2	0,1	2,4	3,3	4,8	TS	TS	TS	TS
LC49	15,8	2,6	15,9	0,2	1,7	1,2	5,6	TS	TS	TS	TS
LC50	16,8	0,7	28,7	1,2	9	27,8	15,7	TS	TS	TS	TS
H1993	24,4	7,3	97,5	11,2	2,2	60,9	31,6	TS	TS	Mut	Mut
H1975	15,6	5,5	329,8	2,1	9,2	53,8	44,9	TS	TS	Mut	TS
HCC827	20,3	6,6	530,9	2,5	10,5	48,6	31,7	TS	TS	TS	TS
H1734	11,2	2,8	125,9	1,7	5	18,4	11	Mut	TS	Mut	TS
H1650	12,2	1,4	21,9	0,2	2,5	10,8	13,7	TS	TS	Mut	TS
H460	0,2	0,1	3,1	0,7	1,1	0,4	1,9	TS	Mut	TS	Mut
H358	4,4	0,9	14,8	1,5	9,2	15,5	3	Mut	TS	TS	TS
A549	15,8	0,6	22	1,6	11,5	16,3	4,9	Mut	TS	TS	Mut

Análisis de mutación génica de muestras tisulares tumorales:

El análisis de mutación de tres genes frecuentemente mutados (KRAS, P53 y STK11) en 50 muestras tisulares de pulmón humano respaldó adicionalmente el agrupamiento de muestras tumorales humanas en los grupos de líneas celulares (véase Tabla 6). Por ejemplo, las muestras de pacientes LC16, LC44 y LC23 se alinearon originalmente con la línea celular tumoral H358 basándose en el perfil de ensayo CEER™. Este alineamiento fue respaldado por el hallazgo de que estas tres muestras tisulares también albergaron las mutaciones de KRAS G34A y G37T como se descubrió en la línea celular H358. De forma similar, el alineamiento original de muestras de pacientes LC45 con la línea celular H1734 y LC21 con la línea celular A549 se verificó al encontrar las mismas mutaciones de KRAS G34A y G37T tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares. Además, el alineamiento de la muestra de paciente LC15 con la línea celular H460 está respaldado por el hallazgo de la mutación de KRAS A183T tanto en la muestra de paciente como en la línea celular. Análogamente, el alineamiento de las muestras de pacientes LC6, LC31 y LC13 con líneas celulares H1975 y H1734 se verificó mediante el hallazgo de las mutaciones de P53 C726G y G818T tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares. Además, el alineamiento de muestras de pacientes LC32 y LC23 con la línea celular H1650 fue respaldado por el hallazgo de las mismas mutaciones de P53 tanto en muestras de pacientes como en la línea celular. Finalmente, el alineamiento de la muestra de paciente LC25 con la línea celular H1993 fue respaldado por el hallazgo de las mutaciones de STK11 C109T y G595T tanto en la muestra del paciente como en la línea celular. Por tanto, el agrupamiento de las muestras tisulares del paciente con las líneas celulares tumorales basadas en el estado mutacional de los genes de KRAS, P53 y STK11 también fue coherente con el agrupamiento basado en las identificaciones de la ruta de RTK.

ANÁLISIS

Los tratamientos actuales para el cáncer de pulmón son menos que óptimos, con una supervivencia media de menos de un año para pacientes con cáncer de pulmón avanzado, independientemente del régimen de tratamiento [Vaporciyan *et al.*, Holland-Frei Cancer Medicine, 5ª edición, BC Decker, pág. 1227-1292 (2000)]. Las nuevas modalidades de tratamiento emergentes generalmente están dirigidas a inhibir las tirosina quinasas específicas activadas en las células tumorales a través de básicamente dos enfoques independientes [Roggli *et al.*, Hum Pathol., Jun; 16(6):569-79 (1985)]. El primer enfoque es usar un anticuerpo monoclonal muy específico para dirigirse a la quinasa receptora del factor de crecimiento de la membrana que es responsable del crecimiento de las células tumorales y el complejo de anticuerpo/antígeno resultante induce al sistema inmunitario del hospedador a destruir las células tumorales. Este enfoque se ejemplifica mediante el tratamiento de cáncer de mama positivo para el receptor Her2/Neu con Herceptina, un anticuerpo monoclonal humanizado contra este receptor [Schiller *et al.*, N Engl J Med., 10 de enero; 346(2):92-8 (2002)]. Sin embargo, el alto coste de fármacos de anticuerpos monoclonales podría ser una desventaja para este enfoque. El segundo enfoque es desarrollar moléculas orgánicas pequeñas que penetran en las células que se dirigen a las tirosina quinasas específicas en las rutas de señalización de las células tumorales. Este enfoque se ejemplifica mejor por el uso de Gleevec para bloquear la activación de la quinasa de fusión BCR-ABL en leucemia mielógena crónica [Comis RL, The Oncologist, Ago; 20(7):467-70 (2005)]. El diseño y la síntesis de inhibidores de tirosina quinasa de moléculas pequeñas se han facilitado en gran medida por la disponibilidad de estructuras cristalinas para las tirosina quinasas en la última década y, por tanto, muchas compañías farmacéuticas grandes y pequeñas han producido inhibidores eficaces de quinasa. No obstante, sin conocimiento previo de las rutas de señalización de quinasa activada responsables de la propagación y metástasis de las células tumorales, no es posible aplicar el enfoque de terapia diana con los inhibidores de quinasa disponibles. Por lo tanto, los inventores han seleccionado un panel de ocho líneas celulares tumorales de pulmón que albergaban las mutaciones génicas detectadas con mayor frecuencia: P53, KRAS, STK11 y EGFR como ejemplos representativos que abarcan los principales subtipos de cáncer de pulmón humano.

El análisis de mutaciones ha proporcionado información valiosa para guiar la terapia dirigida a pacientes con cáncer. Se encuentra un buen ejemplo en pacientes con cáncer que portan una mutación del gen de KRAS porque se ha mostrado que estos pacientes no responden a los productos terapéuticos anti-EGFR. Por lo tanto, el ensayo de mutación de KRAS se está realizando de forma rutinaria en pacientes que están siendo considerados para terapia anti-EGFR con Cetuximab o Panitumumab en Europa y los Estados Unidos [Le Calvez *et al.*, Cancer Res, 65:5076-5083 (2005); Pao *et al.*, PLoS Med., 2:e17 (2005)]. El estudio actual de los inventores confirmó además un papel importante del análisis de mutaciones génicas para guiar el uso de fármacos para tratar cáncer de pulmón. Por ejemplo, se ha informado de que los cánceres de pacientes con adenocarcinoma de pulmón que albergaban mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen de EGFR con frecuencia respondían inicialmente a fármacos de TKI tales como Gefitinib y Erlotinib [Sjoblom *et al.*, Science, 314:268-74 (2006); Potti *et al.*, Nat Med; 12: 1294-300 (2006)], pero habitualmente desarrollaron resistencia a fármacos más tarde [Pao *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA; 101:13306-13311 (2004); Lynch *et al.*, N. Engl. J. Med, 350:2129-2139 (2004); Kwak *et al.*, PNAS 102(21):7665-7670 (2005)]. De hecho, las líneas celulares tumorales de pulmón HCC827, H1975 y H1650 empleadas en este estudio albergaban la mutación del gen de EGFR y se descubrió que eran sensibles al tratamiento con inhibidores de EGFR. Por el contrario, la mutación del gen de KRAS se asocia con resistencia a inhibidores de tirosina quinasa EGFR [Paez *et al.*, Science 304:1497-1500 (2004); Kobayashi *et al.*, N. Engl. J. Med, 352 (20):786-792 (2005)]. Este fenómeno se verifica por el descubrimiento de los inventores de que las células A549 y H460, que albergaban el gen mutado de KRAS, no respondieron al tratamiento con inhibidores de EGFR pero son sensibles al inhibidor de PI3K corriente abajo BEZ-235.

Aunque la terapia dirigida basada en la asociación del análisis de mutación somática y la sensibilidad a fármaco ha facilitado enormemente el tratamiento del cáncer de pulmón, el perfil de rutas de transducción de señales oncogénicas en células y tejidos tumorales humanos ofrece otro enfoque complementario para guiar el tratamiento terapéutico [Judith S. Sebolt-Leopold, *Clin Cancer Res*; 14(12):3651-6 (2008); Rusnak *et al.*, *Cell Prolif*; 40:580-94 (2007); Paull *et al.*, *J Natl Cancer Inst*; 81:1088-92 (1989); McDermott *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:19936-41 (2007); Nakatsu *et al.*, *Mol Pharmacol*; 72:1171-80 (2007)]. El perfil de la ruta de señalización tradicional en muestras tisulares tumorales mediante tinción inmunohistoquímica o métodos de transferencia de Western no es lo suficientemente cuantitativa ni lo suficientemente sensible para tener utilidad cuando solo se dispone de una pequeña cantidad de muestras tisulares tumorales. El ensayo CEER™ es un ensayo que los inventores han desarrollado para superar los problemas de baja sensibilidad y especificidad asociados con estos métodos tradicionales. El ensayo CEER™ utiliza una plataforma de inmunoensayo colaborativo múltiple, basado en proximidad, que puede proporcionar información clínica sobre una cantidad limitada de muestras tisulares con alta sensibilidad y especificidad. El principio del ensayo se basa en la formación de un inmunocomplejo único que requiere la colocación de dos anticuerpos de detección contra una proteína diana una vez que la proteína se captura en la superficie de la micromatriz. Es la formación de este complejo lo que permite la generación de una señal muy específica y sensible para revelar el estado de activación de la proteína diana. Usando este ensayo, se perfilaron las rutas de Her1, Her2, Her3, c-Met, IGF-1R, PI3K y SHC activadas presentes en las ocho líneas celulares tumorales de pulmón así como las 50 muestras tisulares tumorales de pulmón humano. Las líneas celulares que mostraron una o más de estas rutas activadas se trataron con los inhibidores de quinasa correspondientes y los resultados demostraron que este enfoque coincidente es eficaz para inhibir la activación de la ruta y el crecimiento de estas líneas celulares en condiciones de cultivo tanto dependientes de anclaje como independientes de anclaje. Por otra parte, en las líneas celulares en las que no se pudo lograr inhibición significativa del crecimiento con un solo tratamiento con inhibidor de quinasa (H1993, H358 y H1650), un tratamiento combinado con dos inhibidores de quinasa, uno que se dirige a la RTK y el otro que se dirige a una quinasa corriente abajo, fue eficaz en el bloqueo de su proliferación. Por tanto, la caracterización de las rutas de señalización activadas y el estado mutacional, así como su inhibición del crecimiento celular por los inhibidores de quinasa en las líneas celulares tumorales de pulmón podrían facilitar el tratamiento del cáncer de pulmón centrado en la diana.

La realización del perfil de ruta utilizando el ensayo CEER™ y el análisis mutacional de genes de los 50 tejidos tumorales recogidos de pacientes con cáncer de pulmón mostró claramente algunas similitudes en los biomarcadores entre las muestras tisulares tumorales de pulmón y líneas celulares tumorales. Por lo tanto, el panel de biomarcadores de ruta y genes mutados puede diferenciar y agrupar diferentes muestras tisulares tumorales con las líneas celulares tumorales correspondientes en análisis de agrupamiento tanto supervisado como no supervisado y esta información podría usarse para guiar las opciones de tratamiento basadas en la sensibilidad del fármaco de las líneas celulares tumorales.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico en un sujeto que tiene cáncer de pulmón, comprendiendo dicho método:

- 5 (a) determinar el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en un extracto celular producido a partir de una célula cancerosa que se ha aislado de dicho sujeto;
- (b) comparar el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en el extracto celular con un nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en cada una de las siguientes líneas celulares de cáncer de pulmón: HCC827, H1975, H1734, H1993, H358, H1650, A549 y H460;
- 10 en donde se ha determinado que cada fármaco antineoplásico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de HER1, un inhibidor de HER1/2, un inhibidor de HER1/2/4, un inhibidor de c-Met, un inhibidor de IGF-1R, un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K y una combinación de los mismos produce o no produce una respuesta en cada una de las líneas celulares de cáncer de pulmón;
- 15 (c) identificar similitudes entre el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en el extracto celular y en las líneas celulares de cáncer de pulmón; y
- (d) predecir que el cáncer de pulmón del sujeto responderá al mismo fármaco antineoplásico o combinación de los mismos que produce una respuesta en una línea celular de cáncer de pulmón de la etapa (b) basándose en similitudes entre el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en el extracto celular y el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 en la línea celular de cáncer de pulmón.
- 20

2. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 se calibra frente a una curva patrón generada para HER1, HER2 y HER3.

25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho cáncer de pulmón es un cáncer de pulmón no microcítico.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha célula cancerosa se estimula *in vitro* con uno o más factores de crecimiento.

30 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha célula cancerosa se ha aislado de un tejido tumoral de pulmón de dicho sujeto.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (a) comprende además determinar el nivel de fosforilación de un marcador seleccionado del grupo que consiste en una tirosina quinasa receptora, una tirosina quinasa no receptora, un componente de la cascada de señalización de tirosina quinasa, un receptor de hormonas nucleares, un coactivador de receptores nucleares, un represor de receptores nucleares y combinaciones de los mismos.

40 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la etapa (a) comprende además determinar el nivel de fosforilación de al menos uno o más de cMET, IGF-1R, PI3K y/o SHC.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es HCC827 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de HER1, un inhibidor de HER1/2, un inhibidor de HER1/2/4 o combinaciones de los mismos, o

45 en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es H1975 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de HER1/2, un inhibidor de HER1, un inhibidor de IGF-1R o una combinación de un inhibidor de HER1/2 con un inhibidor de MEK o un inhibidor de PI3K, o

50 en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es H1734 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de HER1/2, un inhibidor de HER1, un inhibidor de MEK o combinaciones de los mismos, o

en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es H1993 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de c-Met, un inhibidor de MEK, una combinación de un inhibidor de c-Met con un inhibidor de MEK o un inhibidor de PI3K, o una combinación de un inhibidor de MEK y un inhibidor de PI3K, o

55 en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es H358 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de HER1/2, un inhibidor de HER1, un inhibidor de HER1/2/4, un inhibidor de IGF-1R, una combinación de un inhibidor de HER1 con un inhibidor de MEK o un inhibidor de PI3K, o una combinación de un inhibidor de MEK y un inhibidor de PI3K, o

60 en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es H1650 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de HER1/2, una combinación de un inhibidor de HER1/2 con un inhibidor de PI3K o una combinación de un inhibidor de MEK y un inhibidor de PI3K, o

en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es A549 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de IGF-1R, un inhibidor de MEK, un inhibidor de PI3K o combinaciones de los mismos, o

65 en donde la línea celular de cáncer de pulmón que tiene el nivel de fosforilación similar de HER1, HER2 y HER3 es H460 y se predice que el cáncer de pulmón responderá a un inhibidor de IGF-1R, un inhibidor de PI3K o combinaciones

de los mismos.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa (a) comprende determinar el nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 con un inmunoensayo reactivo potenciado de enzimas colaborativas (CEER).

5 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además el genotipado de ácido nucleico obtenido de dicha célula cancerosa para determinar la presencia o ausencia de un alelo variante en un gen, en donde dicho gen se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en un oncogén, un gen supresor tumoral y combinaciones de los mismos, o

10 en donde dicho oncogén se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en KRAS, BRAF, PIK3CA, EGFR y combinaciones de los mismos, o en donde dicho gen supresor tumoral se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en P53, STK11 y combinaciones de los mismos.

15 11. El método de la reivindicación 10, en donde la determinación de la presencia o ausencia de dicho alelo variante junto con la determinación del nivel de fosforilación de HER1, HER2 y HER3 ayuda o mejora la predicción de la eficacia terapéutica o la respuesta a un fármaco antineoplásico.

20 12. El método de la reivindicación 10 u 11, en donde dicho alelo variante comprende un polimorfismo de un único nucleótido (SNP).

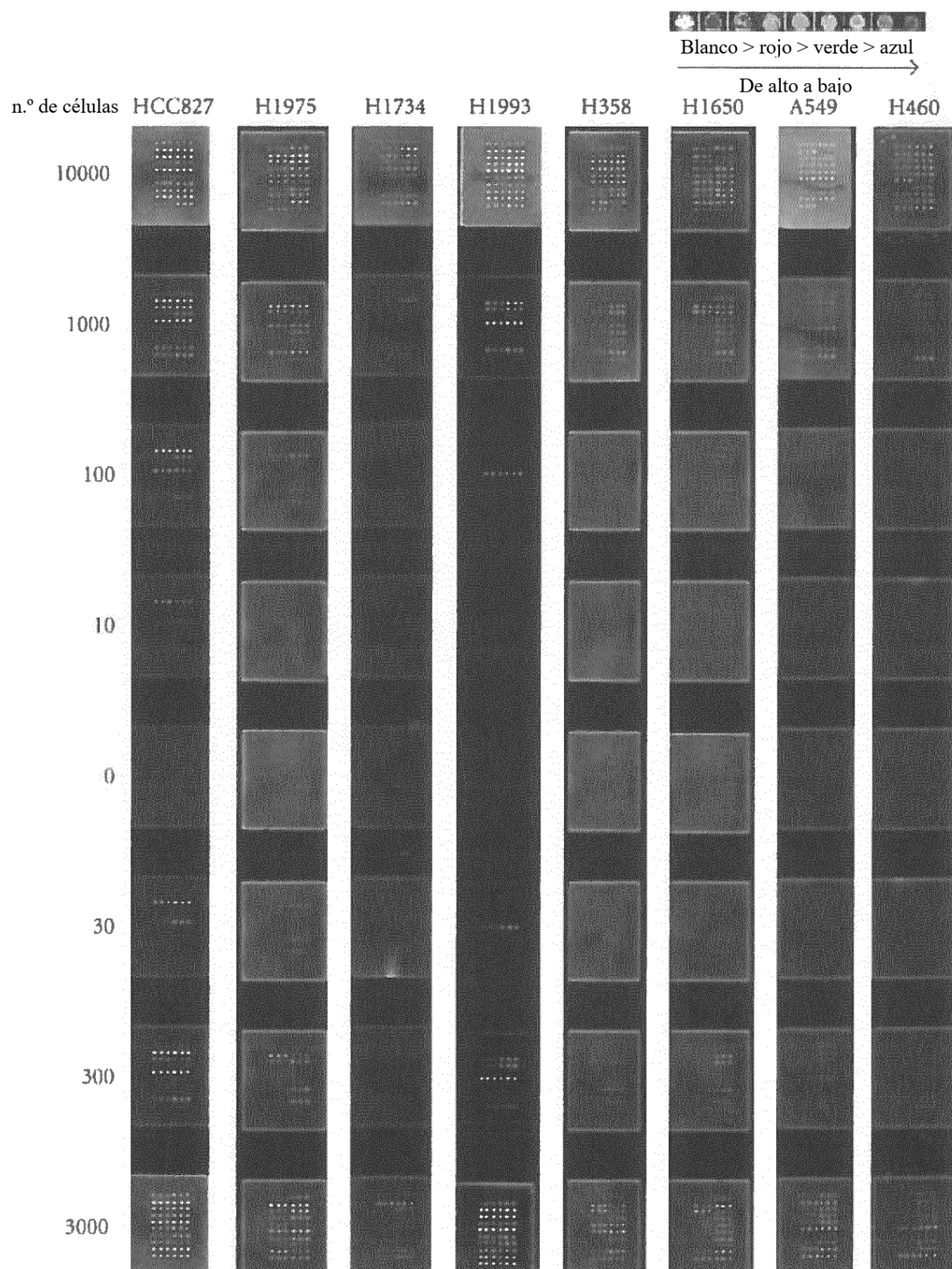


FIG. 1A

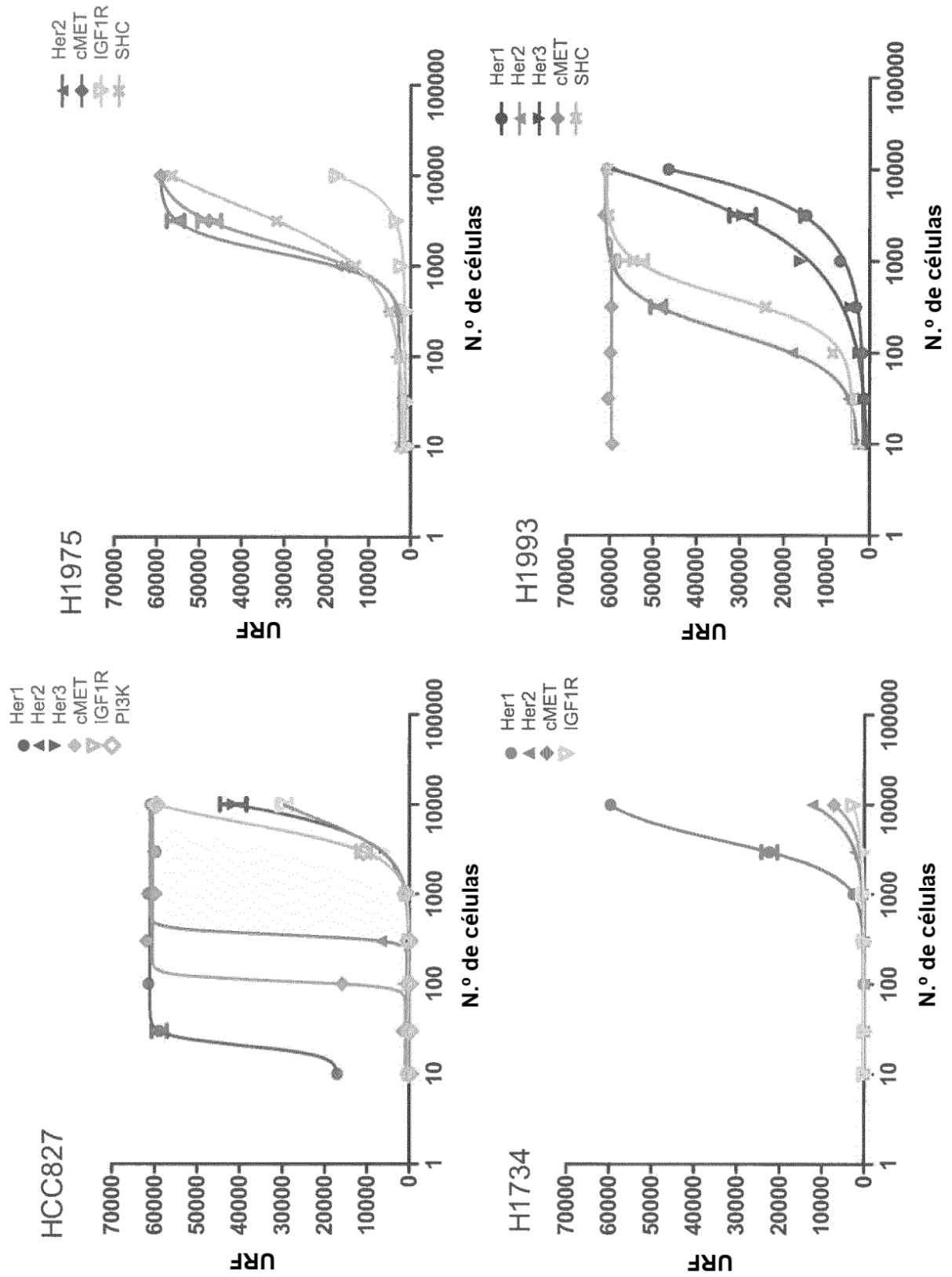


FIG. 1B

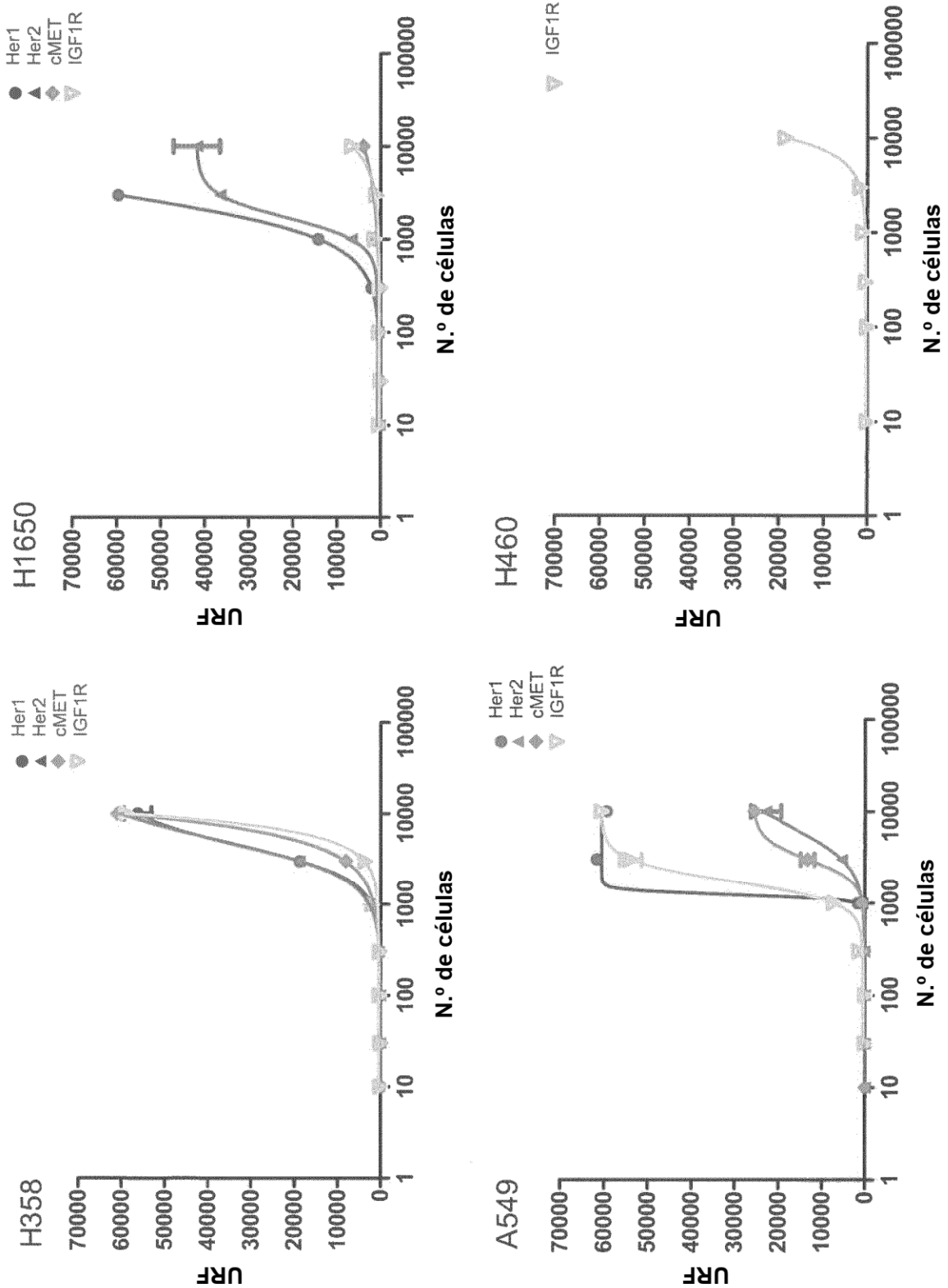


FIG. 1B (continuación)

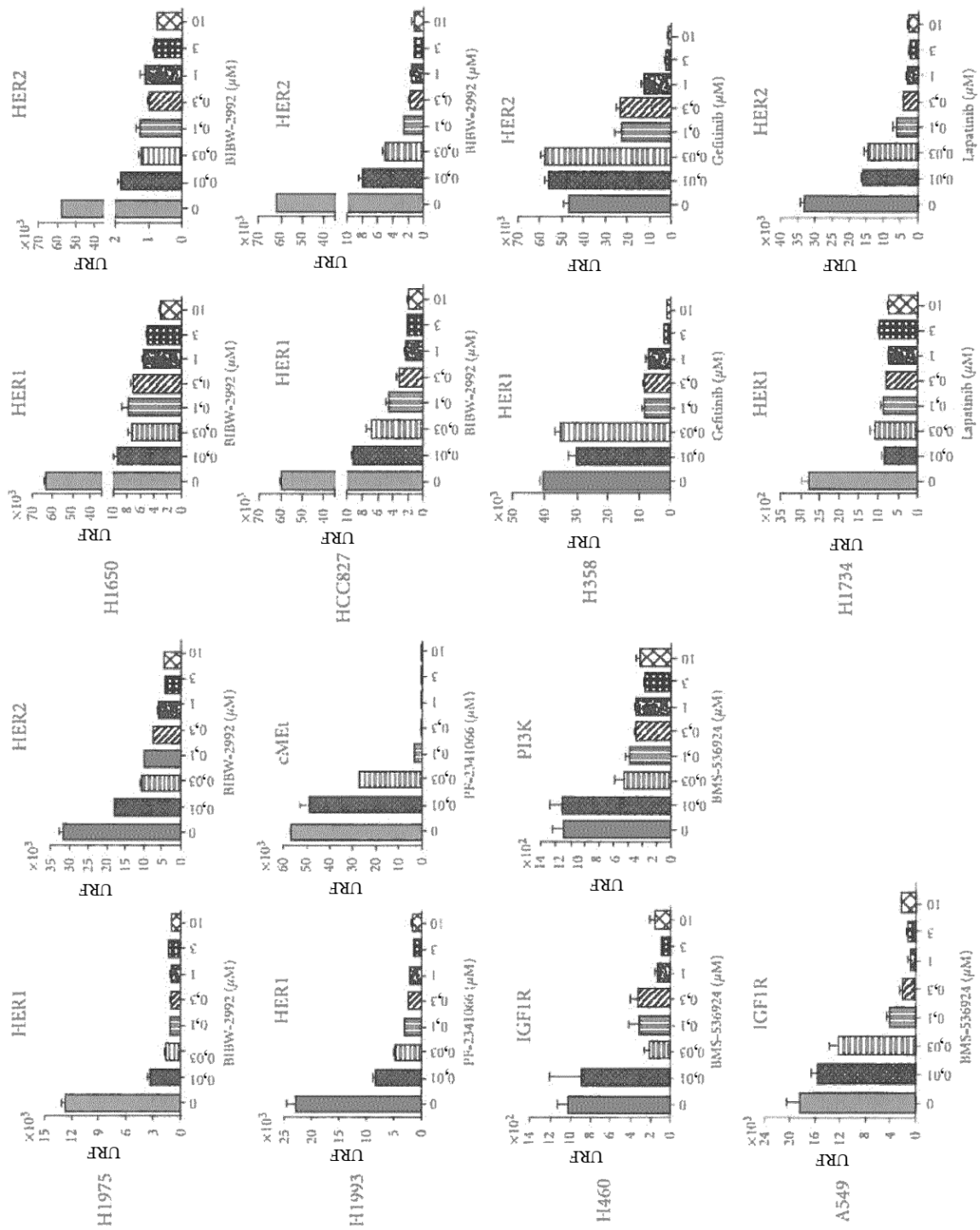


FIG. 2

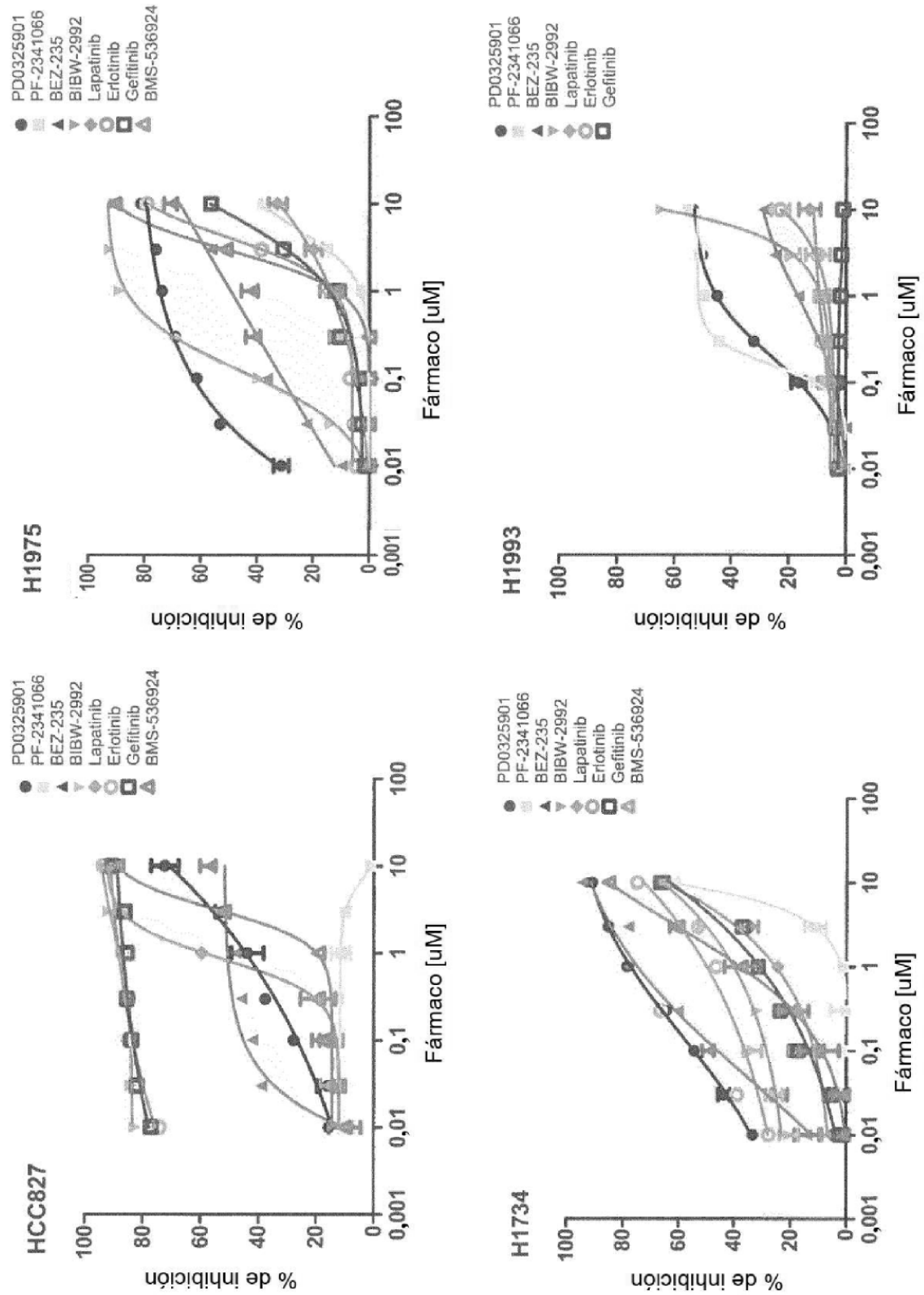


FIG. 3

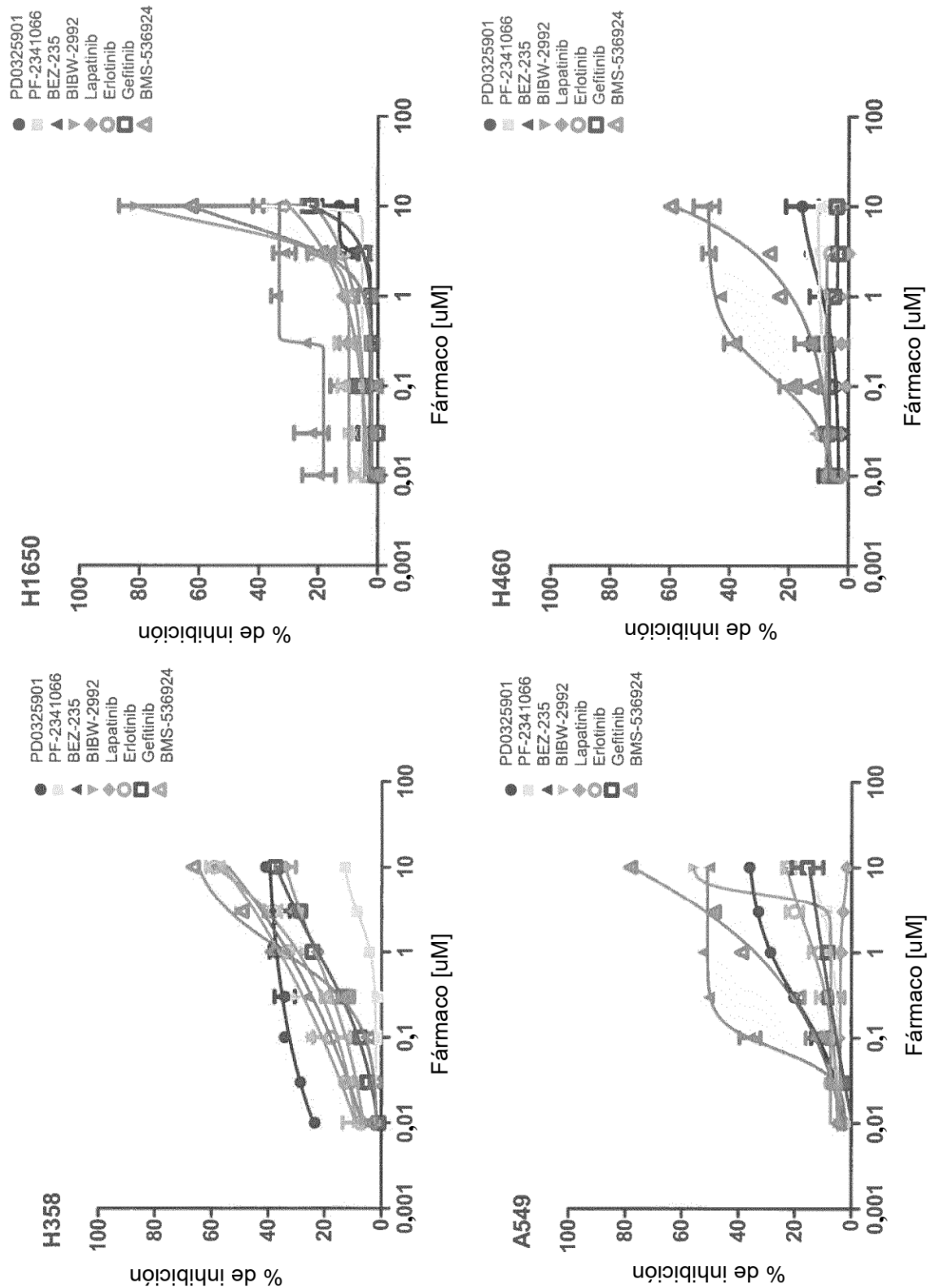


FIG. 3 (continuación)

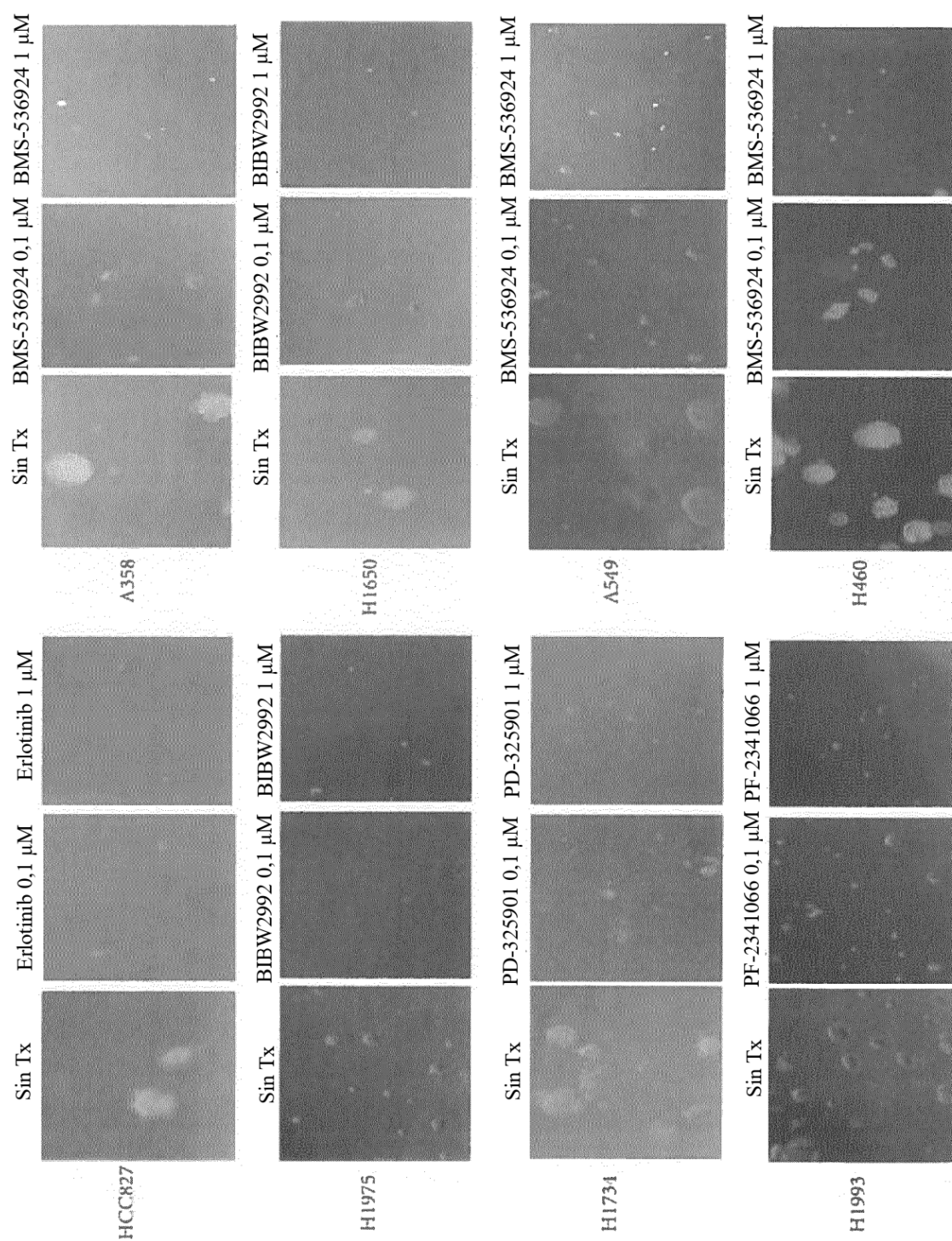


FIG. 4

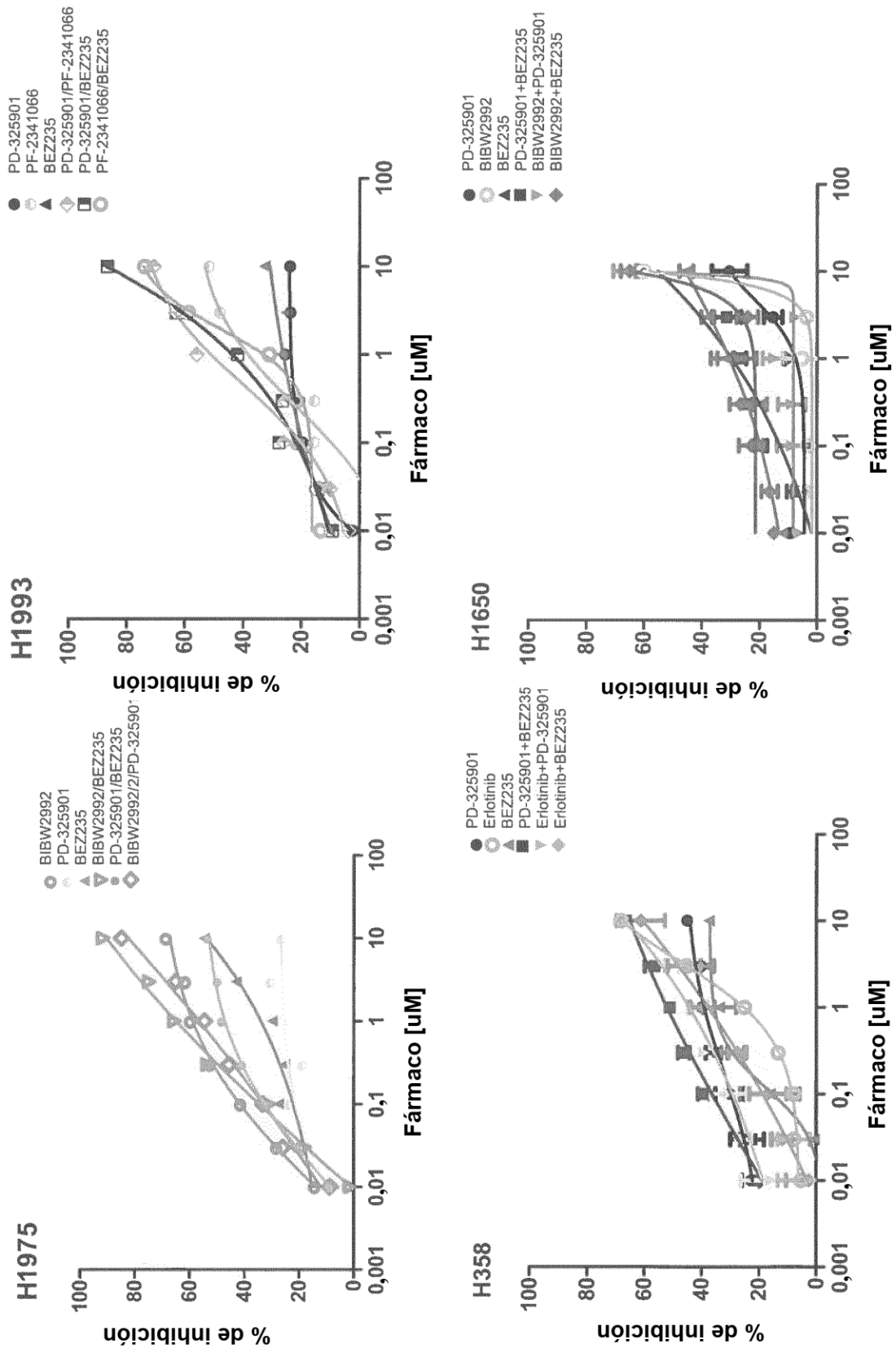


FIG. 5

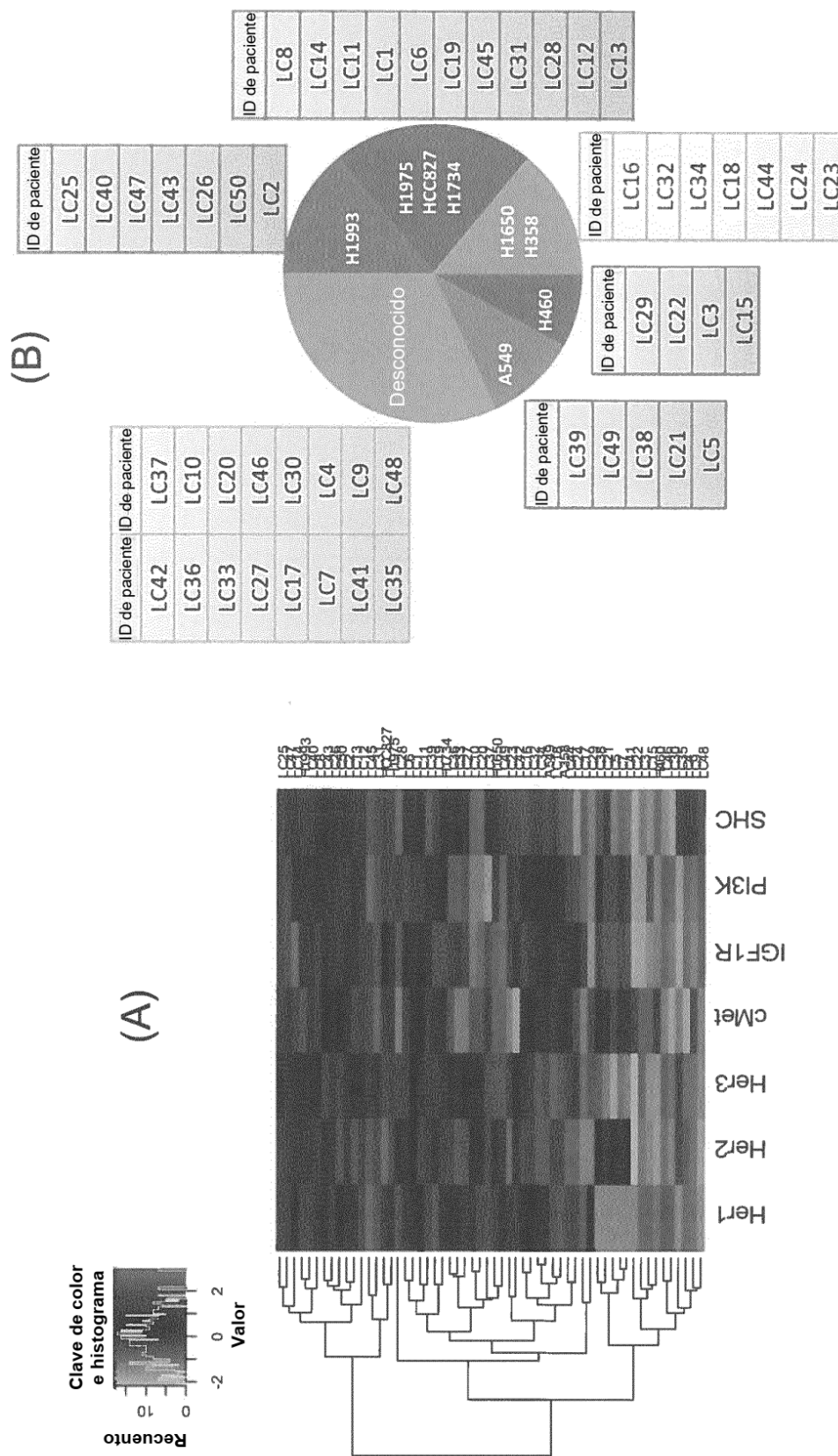


FIG. 6

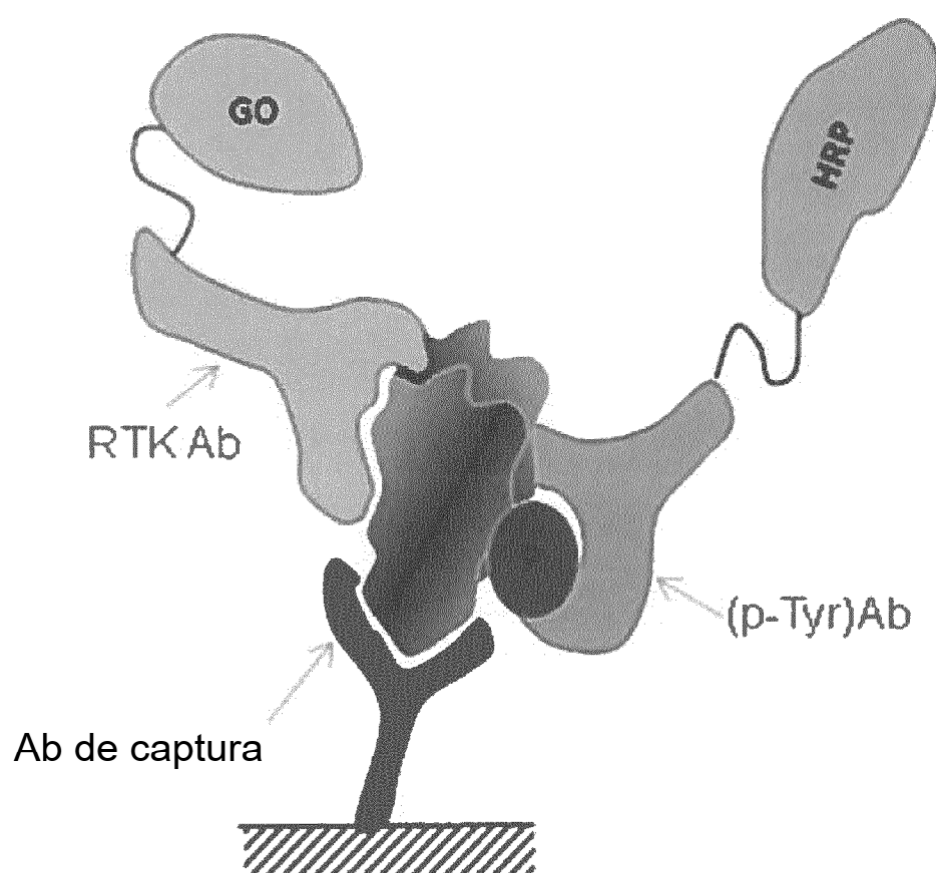


FIG. 7

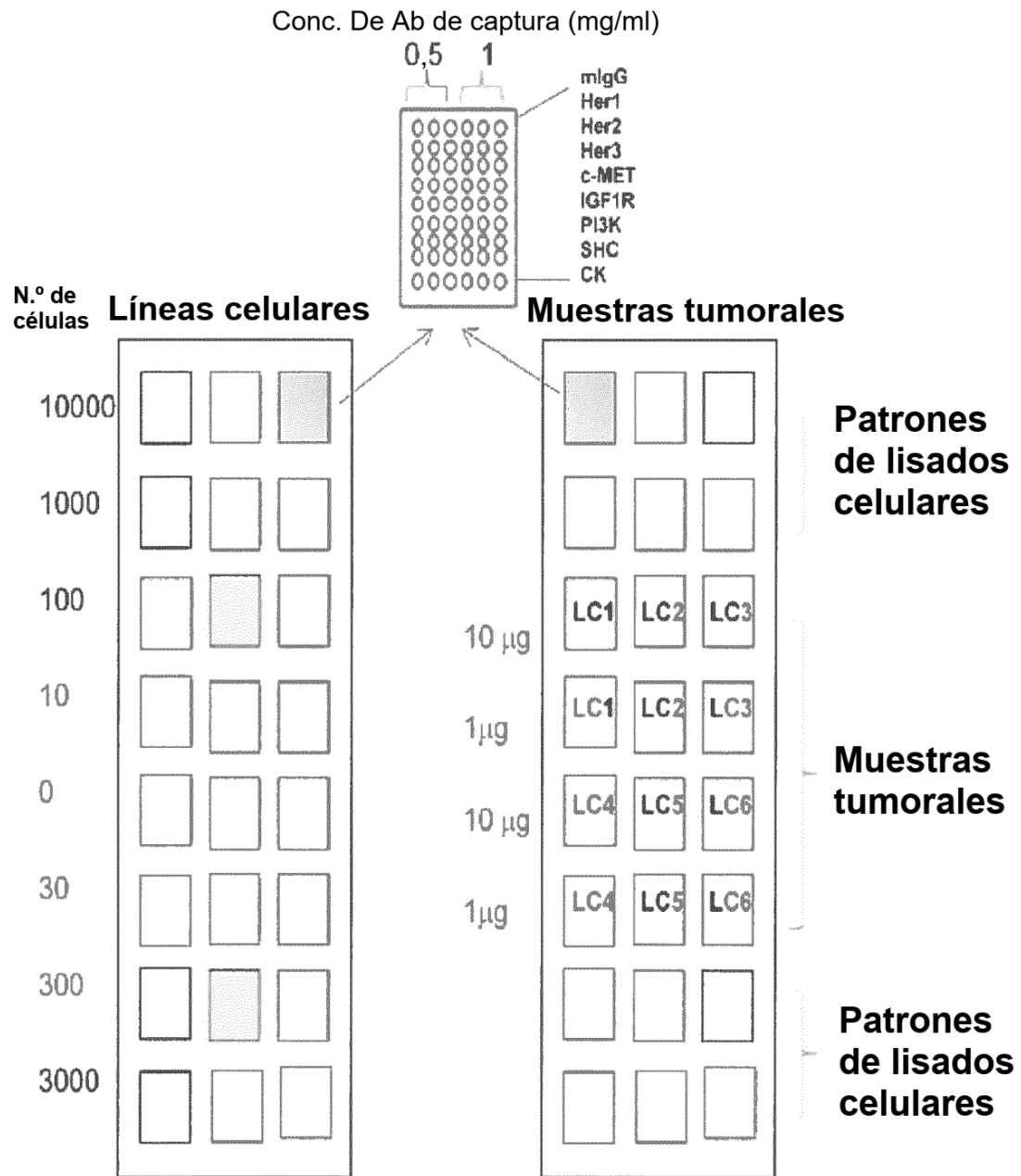


FIG. 8