

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 304**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.09.2012 PCT/US2012/056668**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13044099**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2012 E 12833913 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2748337**

54 Título: **Ensayo de respuesta celular para detectar cáncer y métodos de producción y uso del mismo**

30 Prioridad:

23.09.2011 US 201161538302 P

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

16.04.2020

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS INC.
(100.0%)
511 Benedict Avenue
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:

PUGIA, MICHAEL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 754 304 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

Ensayo de respuesta celular para detectar cáncer y métodos de producción y uso del mismo

Referencia cruzada a solicitud relacionada

- 5 La presente solicitud se basa en la solicitud provisional con n.º de serie 61/538.302, presentada el 23 de septiembre de 2011, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento como referencia.

Declaración referente a investigación o desarrollo con financiación federal

No aplicable.

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 10 El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento se refiere(n) de manera general a ensayos celulares. Más particularmente, pero no a modo de limitación, el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento se refieren a métodos de ensayo de muestras biológicas para determinar la respuesta celular frente a tratamiento/terapia y/o monitorizar la progresión de un estado patológico.

15 Descripción de la técnica anterior

- Habitualmente se usan ensayos de afinidad usando compuestos de fluorescencia para el análisis de células y tejidos para detectar biomarcadores. Los compuestos fluorescentes (etiquetas) se unen (conjugan) a moléculas de afinidad. Dichas moléculas de afinidad pueden ser, por ejemplo, pero no a modo de limitación, anticuerpos, antígenos, ácido nucleico u otras moléculas que se asocian con los biomarcadores de interés. Este método de afinidad directa es un método habitualmente usado para teñir células y tejidos (véase Horan y <http://www.crm.ed.ac.uk/facilities/flow-cytometry/protocols/immunofluorescence-staining>). Las células o tejidos se incuban con conjugados y los materiales no unidos se eliminan mediante lavado a partir de materiales unidos a células. Los conjugados se leen mediante citometría con un citómetro de flujo, microscopio de barrido u otro dispositivo que puede detectar la emisión de fluorescencia del material celular (véase, por ejemplo, el documento US2008/0187198; Krivacic, 2004; y Herzenberg, 2002). Los protocolos varían y pueden requerir o no fijación de células o tejidos, dependiendo del conjugado usado.

- 20 En la práctica, se miden recuentos de células usando tecnologías de citometría de flujo o de microscopía de barrido que capturan señales de células a las longitudes de onda de excitación y de emisión requeridas para detectar el colorante. Pueden determinarse simultáneamente (multiplexarse) diferentes conjugados usando colorantes fluorescentes con longitudes de onda de excitación y longitudes de onda de emisión distintas. Habitualmente se usa multiplexado de señales de fluorescencia para detectar tantas propiedades como sea posible de una vez. Por ejemplo, pueden medirse biomarcadores conjugados con ficoeritrina (ex. 592, em. 614 nm) independientemente de biomarcadores conjugados con 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) (ex. 488, em. 525 nm) usando filtros de excitación y emisión diferentes. Una lista de fluoróforos conocidos está habitualmente disponible para los investigadores en el campo (véase <http://www.fluorophores.org/>).

- 35 Normalmente se realizan ensayos celulares y tisulares para diversos tipos de ensayos de cáncer. Los ensayos tanto celulares como tisulares usan reactivos de afinidad para detectar biomarcadores sobre o dentro de la célula, tales como péptidos, proteínas, ácido nucleico y modificaciones de los mismos (véase, por ejemplo, Punnoose, 2010). Se miden ácidos nucleicos como ARN mensajero, microARN y/o ADN antes o después de amplificación mediante PCR. También se usan anticuerpos para detectar biomarcadores de proteínas tales como, pero sin limitarse a, EGFR, IGFRE, ERBB2, PSA, PL2L, KRAS, EPCAM, CK, y CD. Una variedad de marcadores tumorales han detectado células de cáncer de mama, colon, próstata y melanoma (véase, por ejemplo, Mocellin, 2006). El uso de biomarcadores para monitorizar la progresión y/o el tratamiento de cáncer también es una práctica común. Por ejemplo, el uso del sistema de activador del plasminógeno (uPA) se monitoriza midiendo uPA, el inhibidor de plasminógeno PAI-1, y el complejo de ambos (véase Carney *et al.*, 2009).

- 45 Con frecuencia los ensayos celulares buscan acontecimientos poco frecuentes pero clínicamente significativos. Por ejemplo, las células tumorales circulantes (CTC) son significativas a 5 células cancerosas en 80.000.000 células sanguíneas normales. Las CTC deben aislarse mediante enriquecimiento o agotamiento para eliminar la interferencia a partir de células normales (véase, por ejemplo, Pantel *et al.*, 2008). Después tienen que someterse a ensayo las células de interés poco frecuentes aisladas mediante métodos que pueden detectar cada célula individual. Adicionalmente, los biomarcadores expresados en esas células pueden ser de tan sólo 100 moléculas por célula. En conjunto, se requieren métodos de detección de alta sensibilidad.

La sensibilidad de etiquetas fluorescentes tradicionales para detectar biomarcadores es generalmente escasa para análisis de células poco frecuentes. Deben usarse moléculas de afinidad en exceso para aumentar el número de sondas asociadas con la célula o el tejido. Este problema puede superarse parcialmente usando enzimas para

5 aumentar de manera catalítica el número de etiquetas fluorescentes. Por ejemplo, la amplificación de señal de tiramida (TSA) usa enzima peroxidasa para catalizar la deposición de múltiples fluoróforos sobre tirosinas de proteínas mediante formación de tiramida con fluoróforos marcados con etiqueta fenólica. La enzima está asociada con una etiqueta de afinidad para dirigir qué células se hacen reaccionar (véase, por ejemplo, Bobrow *et al.*, 1993). Sin embargo, la amplificación enzimática implica múltiples etapas largas que aumentan la dificultad de las mediciones.

10 Pueden usarse nanopartículas para aumentar el número de etiquetas fluorescentes. Sin embargo, también deben unirse múltiples moléculas de afinidad a las nanopartículas, y la adsorción de compuestos orgánicos sobre nanopartículas también disminuye las señales de fluorescencia. Como resultado, las nanopartículas con etiquetas fluorescentes (tales como FITC) no son más sensibles que las etiquetas fluorescentes conjugadas directamente. Problemas adicionales con las nanopartículas son que el tamaño y el recubrimiento deben controlarse cuidadosamente para que las partículas atraviesen las paredes celulares (véase, por ejemplo, Goodman *et al.*, 2007).

15 Los elementos de las tierras raras, tales como el europio (Eu), cuando se quelan, o en estructuras reticulares de óxidos o silicatos, tienen comportamientos fluorescentes o luminiscentes que permiten la detección de los mismos en un método con alta sensibilidad. Estos fósforos se han usado como señales de alta sensibilidad para la detección de material. Por ejemplo, Ryan *et al.* (1973) explicaron por primera vez el uso de fósforos activados con metal de las tierras raras para detectar material explosivo. Las nanopartículas que contienen el fósforo con europio pueden ser fluorescentes en un intervalo de 500 a 700 nm y por tanto pueden ser útiles como trazador para explosivos.

20 La quelación de europio es crítica para la estabilidad e intensidad de la señal de fluorescencia. Desde hace mucho se ha mostrado que el europio forma un quelato fuerte con beta-dicetonas. Shepard y Serigne (1934) han mostrado que la tenoitrifluoracetona (TTA) tiene una constante de asociación (log Ka) de 8,0 cuando se convierte en enolato. Stary (1959) demostró que la benzoilacetona (HBA) tiene una log K de 18,9. Haar y Umland (1962) mostraron que la 8-hidroxiquinolina (oxina) forma un oxinato con europio. Dyrssen (1956) describe la constante de disociación de beta-isopropiltropolona (HIPT) de log K - 6,24. Eu^{2+} se asemeja a Ba^{2+} y puede complejarse mediante diversos iones de policarboxilato de amina tales como DTPA (log Ka 23), DCTA (log Ka 19), EDTA (log Ka 17), HEDTA (log Ka 15), HTA (log Ka 11) e IMDA (log Ka 6). Matsumoto *et al.* (2007) demostraron que el europio con una variedad de quelatos en nanopartículas de silicato puede ser un fluoróforo en el intervalo de 500 a 700 nm. Ullman *et al.* (1994) y Kraus *et al.* (2001) demostraron el europio con una variedad de quelatos en nanopartículas de poliestireno. En particular, tetrakis(ácido acético) de N,N,N,N'-{2,6-bis(3'-aminometil-1"-pirazolil)-4-fenilpiridina} (BBTA) y 3-(2-tienoil)-1,1,1-trifluoroacetona (TTA) son útiles. En general, se ha mostrado que una amplia variedad de compuestos se complejan con elementos lantánidos (por ejemplo, pero no a modo de limitación, europio (Eu)), y este complejo proporciona estabilidad e intensidad a las señales de fluorescencia.

35 En la práctica, se han aplicado etiquetas de metales de las tierras raras (tales como, pero sin limitarse a, lantánidos tales como Eu, Sm, Tm, Pr) u otros tales como Tb como tecnología de detección luminiscente o fluorescente de alta sensibilidad en nanopartículas (Ullman *et al.* 1994; Kraus *et al.*, 2001; y Harma *et al.*, 2001). Estas etiquetas se han aplicado a diversos métodos analíticos para diagnósticos clínicos usando nanopartículas. Ullman *et al.* demostraron que nanopartículas que contienen quelato de europio eran útiles en el diagnóstico como etiquetas de biomarcador que generan luminancia. Kraus *et al.* también mostraron que nanopartículas con quelato de europio (tales como, pero sin limitarse a, Eu TTA_3) podían detectarse por encima de 500 nm y eran útiles como etiquetas de diagnóstico para biomarcadores. Harma *et al.* mostraron las ventajas de fluorescencia de resolución en el tiempo usando tecnología de detección de etiquetas de europio. En general, la fluorescencia de europio o bien es una etiqueta de alta sensibilidad aceptable cuando se usa la señal directamente o bien se amplifica con reacciones posteriores.

45 Otro tipo de etiqueta fluorescente es una molécula que se une directamente al biomarcador o a una sonda. Estas etiquetas no necesitan moléculas de afinidad. Por ejemplo, diclorhidrato de 4',6-diamidino-2'-fenilindol (DAPI) es una sonda que emite fluorescencia de color azul (455 nm) cuando se une a ADN de cadena doble y se excita mediante exposición a luz a 345 nm (véase, por ejemplo, Morikawa *et al.*, 1981). La detección de ADN en células es una indicación de un núcleo de célula viva. Otras sondas que contienen grupos bis(cinc²⁺dipicolilamina) se unen a superficies enriquecidas con fosfolípidos aniónicos, especialmente fosfatidilserina (PS) expuesta sobre membranas celulares (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7.1.9,616). La aparición de fosfatidilserina (PS) sobre la superficie celular indica apoptosis celular, antes de la fragmentación de ADN, cambios morfológicos y permeabilización de membrana plasmática.

50 En conjunto, se sabe que pueden realizarse ensayos celulares y tisulares mediante ensayos de afinidad ya sea usando reactivos de afinidad con etiquetas fluorescentes o sondas fluorescentes. También se sabe que estas señales pueden multiplexarse, y se necesitan sondas y etiquetas de alta sensibilidad para detectar acontecimientos poco frecuentes. Además, se sabe que pueden seleccionarse biomarcadores para aplicaciones de ensayo en el campo de cáncer.

55 Se usan ensayos celulares y tisulares en el campo de cáncer para dirigir el tratamiento. Con la entrada de más quimioterapias basadas en anticuerpos, debe tipificarse el cáncer de un paciente para garantizar que está presente el antígeno canceroso (medicina personalizada). El número de antígenos cancerosos cada vez mayor está

volviéndose cada vez más complejo (véase, por ejemplo, Cheever *et al.*, 2009). Como resultado, la selección de biomarcadores para someter a prueba es una elección difícil; deben tenerse en cuenta todos del nivel de expresión, número de epítomos, expresión sobre células madre cancerosas, ubicación celular de la expresión, y el número de pacientes con cánceres positivos para antígeno. Los antígenos con función terapéutica, inmunogenicidad (expresión en células T), oncogenicidad (asociación con el proceso oncogénico) y especificidad son los que tienen una clasificación de más valor. Incluso con una clasificación, la selección no es sencilla y necesita una simplificación; todavía es probable escoger el antígeno equivocado para un paciente, y no pueden medirse todos los antígenos de una vez.

La quimiorresistencia es otro parámetro importante que los ensayos celulares y tisulares intentan abordar midiendo células y tejido durante el transcurso del tratamiento para determinar si todavía están presentes antígenos cancerosos. Otro método para determinar la quimiorresistencia es cultivar o hacer crecer las células cancerosas y ver si se expresan los antígenos cancerosos por células vivas (véase, por ejemplo, el denominado método EPISPOT de Alix-anabieres *et al.*, 2009). Otro método es medir los antígenos de células madre cancerosas como medida de quimiorresistencia (véase por ejemplo, Pardal *et al.*, 2003; y Gao *et al.*, 2010). Sin embargo, estos tres métodos se basan todos ellos en “escoger” el antígeno correcto y no logran dar buena información para todos los pacientes.

Por tanto, el campo actual carece de una medición exhaustiva del potencial metastásico de una célula/tejido canceroso. El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento proporciona(n) un ensayo de respuesta basado en células que supera los defectos y las desventajas de la técnica anterior.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 representa gráficamente un ensayo de respuesta celular construido según el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

Antes de explicar en detalle al menos una realización del/de los concepto(s) inventivo(s) a modo de dibujos, experimentos, resultados y procedimientos de laboratorio a modo de ejemplo, debe entenderse que el/los concepto(s) inventivo(s) no se limita(n) en cuanto a su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos, experimentos y/o resultados. El/los concepto(s) inventivo(s) puede(n) implementarse en otras realizaciones o ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas maneras. Como tal, se pretende que a la terminología usada en el presente documento se le asigne el alcance y significado más amplio posibles; y se pretende que las realizaciones sean a modo de ejemplo, no limitativas. Además, debe entenderse que las frases y terminología empleadas en el presente documento sean con fines de descripción y no deben considerarse como limitativas.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento tendrán los significados que entienden habitualmente los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que se requiera lo contrario por el contexto, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular y química e hibridación de proteínas y oligo o polinucleótidos descritas en el presente documento son las que se conocen bien y se usan habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Se realizan reacciones enzimáticas y técnicas de purificación según las especificaciones del fabricante o tal como se logra habitualmente en la técnica o tal como se describe en el presente documento. Las técnicas y los procedimientos anteriores se realizan generalmente según métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y se comentan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Coligan *et al.* *Current Protocols in Immunology* (Current Protocols, Wiley Interscience (1994)). Las nomenclaturas usadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química de síntesis orgánica, y química medicinal y farmacéutica descritos en el presente documento son los que se conocen bien y se usan habitualmente en la técnica. Se usan técnicas convencionales para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Todas las patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones no de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a la que se refiere(n) el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento.

Todas las composiciones y/o los métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los métodos de este/estos concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento se han descrito en cuanto a realizaciones preferidas, resultará evidente para los expertos en la técnica que pueden

5 aplicarse variaciones a las composiciones y/o los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descritos en el presente documento sin alejarse del concepto, espíritu y alcance del/de los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento. Se considera que todos de tales sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu, alcance y concepto del/de los concepto(s) inventivo(s) tal como se define(n) en las reivindicaciones adjuntas.

10 Tal como se usan según la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados: El uso de la palabra “un” o “una”, cuando se usa junto con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede significar “uno”, pero también es compatible con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término “o” en las
15 reivindicaciones se usa para querer decir “y/o” a menos que se indique explícitamente que se refiere únicamente a alternativas o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la divulgación soporta una definición que se refiere únicamente a alternativas y a “y/o”. A lo largo de la totalidad de esta solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que está empleándose para determinar el valor, o la variación que existe entre sujetos de estudio. Se entenderá que el uso del término “al menos uno” incluye uno así como cualquier cantidad mayor de uno, incluyendo, pero sin limitarse a, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, etc. El término “al menos uno” puede extenderse hasta 100 ó 1000 o más, dependiendo del término al que va unido; además, las cantidades de 100/1000 no deben considerarse como limitativas, ya que límites superiores también pueden producir resultados satisfactorios.

20 El término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que está empleándose para determinar el valor y/o la variación que existe entre sujetos de estudio.

25 Tal como se usa en esta memoria descriptiva y la(s) reivindicación/reivindicaciones, las palabras “que comprende” (y cualquier forma de “que comprende”, tal como “comprender” y “comprende”), “que tiene” (y cualquier forma de “que tiene”, tal como “tener” y “tiene”), “que incluye” (y cualquier forma de “que incluye”, tal como “incluye” e “incluir”) o “que contiene” (y cualquier forma de “que contiene”, tal como “contiene” y “contener”) son inclusivas o abiertas y no excluyen etapas de método o elementos adicionales no mencionados.

30 El término “o combinaciones de los mismos” tal como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos indicados que preceden al término. Por ejemplo, se pretende que “A, B, C o combinaciones de los mismos” incluya al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Continuando con este ejemplo, se incluyen expresamente combinaciones que contienen repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, MB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, y así sucesivamente. El experto en la técnica entenderá que normalmente no hay ningún límite sobre el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que resulte evidente lo contrario a partir del contexto.

35 Se entenderá que el término “sonda” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de reactivo de afinidad que se une a un biomarcador específico tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de sondas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (o fragmentos de unión o derivados de los mismos), receptores, moléculas orgánicas, moléculas inorgánicas, ligandos, ácidos nucleicos (incluyendo, pero sin limitarse a, ADN, ARN, microARN, ARNm, ARNip, etc.), péptidos, polipéptidos, proteínas, epítomos, antígenos, ligandos, receptores, complejos, lípidos, glicoproteínas, glicolípidos, glicosaminoglicanos, carbohidratos, policarbohidratos, glicoconjugados y cualquier combinación o derivado de los mismos.
40

45 Se entenderá que el término “biomarcador” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sitio diana sobre la superficie o dentro de una célula por el que puede tener afinidad una sonda y por tanto puede unirse a dicho resto. El “biomarcador” puede ser, por ejemplo, pero no a modo de limitación, un ácido nucleico, péptido, polipéptido, proteína, epítomo, antígeno, ligando, receptor, complejo (es decir, un complejo de MHC-péptido), lípido, glicoproteína, glicolípido, glicosaminoglicano, carbohidrato, policarbohidrato, glicoconjugado y cualquier combinación o derivado de los mismos.

50 Los términos “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan en el presente documento para hacer referencia a un polímero de residuos de aminoácido. El término “polipéptido” tal como se usa en el presente documento es un término genérico para hacer referencia a proteína nativa, fragmentos de proteína o análogos de una secuencia de polipéptido. Por tanto, proteína nativa, fragmentos de proteína y análogos son especies del género polipéptido.

55 Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan de manera intercambiable. Se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, o bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los siguientes son ejemplos no limitativos de polinucleótidos: regiones codificantes o no codificantes de un gen o fragmento génico, loci (locus) definidos a partir de análisis de uniones, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótido. Si están presentes, pueden conferirse modificaciones a la estructura de

nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes distintos de nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje con etiqueta. Los términos “ácido nucleico aislado” y “polinucleótido aislado” se usan de manera intercambiable; se considera que un ácido nucleico o polinucleótido está “aislado” si: (1) no está asociado con la totalidad o una porción de un polinucleótido en el que se encuentra el “polinucleótido aislado” en la naturaleza, (2) está unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio, y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que presenten la actividad biológica deseada. Por tanto, los términos “anticuerpo” o “péptido(s) de anticuerpo” se refieren a una molécula de inmunoglobulina de longitud completa (es decir, un anticuerpo intacto), o a un fragmento de unión de la misma que compite con el anticuerpo intacto por la unión a un antígeno específico. Pueden producirse fragmentos de unión mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fv con enlace disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un único dominio (tales como, pero sin limitarse a, NANOBODIES®) y otros fragmentos de anticuerpo que conservan al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Véase, por ejemplo, Hudson *et al.* (Nature Med., 9:129-134 (2003)).

El término “fragmento de unión a antígeno” o “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a un antígeno. La función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, Fv con enlace disulfuro, Fd, diacuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de un único dominio (tal como, pero sin limitarse a, NANOBODIES®), CDRH3 aislada, y otros fragmentos de anticuerpo que conservan al menos una porción de la región variable de un anticuerpo intacto. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas recombinantes y/o enzimáticas convencionales y se examinan para determinar la unión a antígeno de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término “epítopo” incluye cualquier determinante de proteína que puede unirse de manera específica a un receptor de células T o inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, un epítopo es una región de un antígeno a la que se une específicamente un anticuerpo. Los determinantes epitópicos incluyen habitualmente agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo, o grupos sulfonilo. En determinadas realizaciones, un epítopo puede tener características estructurales tridimensionales específicas (por ejemplo, un “epítopo conformacional”), así como características de carga específicas.

El término “nanopartícula” tal como se usa en el presente documento se refiere a una partícula que tiene dimensiones de desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5000 nanómetros, y que tiene cualquier tamaño, forma o morfología. Las nanopartículas usadas según la presente invención pueden producirse de manera natural, ser nanopartículas comercialmente disponibles, o las nanopartículas pueden sintetizarse para su uso según la presente invención, tal como se describe a continuación en el presente documento y tal como se conoce en la técnica. Los ejemplos particulares de nanopartículas que pueden usarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, nanopartículas de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), nanopartículas de poli(ácido láctico) (PLA), nanopartículas de quitosano, liposomas, y derivados o combinaciones de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “etiqueta” o “marcado con etiqueta” se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante unión de una etiqueta fluorescente, enzimática o colorimétrica o a la incorporación de un aminoácido radiomarcado. En la técnica se conocen diversos métodos de marcar con etiqueta polipéptidos y glicoproteínas y pueden usarse. Los ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa del rábano, β-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, etiquetas de epítomos). En algunas realizaciones, se unen etiquetas mediante brazos separadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

Los términos “etiqueta”, “marcador detectable” y “resto de detección” se usan de manera intercambiable en el presente documento.

Puede emplearse un fluoróforo en los métodos de la presente invención y detectarse mediante cualquiera de numerosos métodos de detección colorimétricos y de fluorescencia. Dependiendo de la aplicación y el propósito, tales métodos incluyen, pero no se limitan a, espectroscopía de absorbancia, espectroscopía de fluorescencia,

citometría activada por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), y similares.

Pueden emplearse diversos tipos de fluoróforos, dependiendo de la aplicación y el propósito, según la presente invención. A continuación en el presente documento se describen ejemplos de fluoróforos adecuados. Se facilitan otros ejemplos en las patentes estadounidenses n.ºs 7.465.747 y 7.955.859, concedidas a Matsumoto *et al.* el 16 de diciembre de 2008 y el 7 de junio de 2011, respectivamente; y la publicación estadounidense n.º US2007/0026407, publicada el 1 de febrero de 2007 (cuyos contenidos completos se incorporan expresamente en el presente documento como referencia en su totalidad).

En la bibliografía de la técnica está disponible una amplia orientación referente a la selección de fluoróforos, métodos de unión de fluoróforos a diversos tipos de moléculas, y métodos de uso de los mismos [por ejemplo, véase: Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5ª ed., Molecular Probes, Inc. (1994); patente estadounidense n.º 6.037.137 concedida a Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press Nueva York, N.Y. (1995); Kay M. *et al.*, 1995. *Biochemistry* 34:293; Stubbs *et al.*, 1996. *Biochemistry* 35:937; Gakamsky D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer", en "Receptores: A Practical Approach", 2ª ed., Stanford C. y Horton R. (eds.), Oxford University Press, R.U. (2001); patente estadounidense n.º 6.350.466 concedida a Targesome, Inc.]. Por tanto, no se considera necesaria una descripción adicional.

En el presente documento se entenderá que los términos "aumento sustancial" y "disminución sustancial", así como equivalentes gramaticales de los mismos, se refieren a un aumento o disminución de al menos el 12%, tal como un aumento o disminución de al menos el 30%, un aumento o disminución de al menos el 50%, un aumento o disminución de al menos el 75%, o un aumento o disminución de al menos el 90%.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren al, o describen el, estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma y sarcoma. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cuello y cabeza.

Se entenderá que el término "metástasis" tal como se usa en el presente documento se refiere a la propagación de cáncer desde un tumor primario hasta otras partes del cuerpo. La metástasis es un proceso secuencial de múltiples etapas en el que células tumorales se desprenden de un tumor primario, migran a través de la membrana basal y la matriz extracelular, e invaden los sistemas linfático y/o sanguíneo. Esto va seguido por el establecimiento de tumores secundarios en sitios distantes.

"Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo ser humano, animales domésticos y de granja, primates no humanos, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc.

El término "paciente" incluye sujetos humanos y veterinarios. En determinadas realizaciones, un paciente es un mamífero. En determinadas otras realizaciones, el paciente es un ser humano.

Se entenderá que el término "muestra biológica" tal como se usa en el presente documento se refiere a una muestra de líquido biológico. Las muestras biológicas incluyen, pero no se limitan a, sangre, plasma, suero, esputo, líquido cefalorraquídeo (CSF), lágrimas, mucosa, orina, tejido, otros tipos de muestras, y similares.

La frase "proporcionar una muestra biológica" tal como se usa en el presente documento se refiere a obtener una muestra biológica para su uso en métodos descritos y reivindicados en el presente documento. Lo más frecuentemente, esto se realizará extrayendo una muestra de células a partir de un animal, pero también puede realizarse usando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento y/o con otro fin). La etapa de "proporcionar una muestra biológica" puede incluir además diversas etapas de aislamiento y/o purificación conocidas en la técnica para proporcionar un componente específico de una muestra biológica para su uso en los métodos descritos y reivindicados en el presente documento.

Numerosos aspectos y ventajas del/de los concepto(s) inventivo(s) resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras considerar la siguiente descripción detallada que proporciona aclaración de la práctica del/de los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento.

El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento se refiere(n) de manera general a ensayos de conjugados de afinidad directos multiplexados de células usando sondas que pueden determinar una respuesta celular frente a tratamientos; este tipo de ensayo se denomina en el presente documento "ensayo de respuesta celular".

5 El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento se refiere(n) de manera general al uso de una combinación de biomarcadores para tipo de célula/tejido canceroso, potencial metastásico y quimiorresistencia en un ensayo de afinidad multiplexado para células y tejido cancerosos. O bien se conjugan etiquetas fluorescentes a moléculas/reactivos de afinidad o bien pueden unirse directamente al biomarcador y se denominan en el presente documento sondas marcadas con etiqueta. Esta combinación de sondas marcadas con etiqueta para biomarcadores permite la determinación de la respuesta celular frente a tratamientos midiendo simultáneamente el tipo de célula, la naturaleza de quimiorresistencia y el potencial metastásico y/o viabilidad celular, y permite señales multiplexadas simples con alta sensibilidad.

10 Sorprendentemente, los marcadores de afinidad de biomarcador seleccionados en este orden resuelven el problema de “escoger” el antígeno correcto para el tipo de antígeno canceroso y también proporcionan información precisa sobre la respuesta frente a terapia. Más particularmente, el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento se refiere(n) a métodos de uso de dichas moléculas de afinidad y sondas moleculares como composiciones, formas de dosificación y kits.

15 El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento combina(n) biomarcador(es) celular(es) para tipo de tejido con biomarcador(es) para potencial metastásico y biomarcador(es) para viabilidad celular en un ensayo de afinidad para células y tejido cancerosos. En la figura 1, el biomarcador para tipo de célula cancerosa se representa como biomarcador A y siempre está presente en el estado patológico. El biomarcador para potencial metastásico se representa como biomarcador B y está presente en el estado patológico con potencial de invasividad metastásica. El biomarcador para quimiorresistencia se representa como biomarcador C y está presente en células insensibles. Se usan etiquetas fluorescentes o bien conjugadas con los reactivos de afinidad o bien que pueden unirse directamente al biomarcador para detectar simultáneamente los biomarcadores A, B y C; se obtiene detección simultánea usando etiquetas fluorescentes que pueden detectarse a longitudes de onda de excitación y/o de emisión diferentes.

25 La respuesta deseada frente al tratamiento sería en primer lugar que disminuya en conjunto el número de células cancerosas. Sin embargo, la respuesta inesperada identificada mediante el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento es que el biomarcador B (es decir, potencial metastásico) aumenta o se vuelve presente en el transcurso del tratamiento en una proporción mayor de células cancerosas detectadas mediante el biomarcador A, y que el biomarcador C (es decir quimiorresistencia) disminuye o se vuelve ausente en el transcurso del tratamiento en una proporción mayor de células cancerosas detectadas mediante el biomarcador A. Con el fin de que esta combinación de biomarcadores celulares prediga correctamente la respuesta, el biomarcador para tipo de tejido, potencial metastásico y viabilidad celular deben relacionarse bioquímicamente en un proceso. Los biomarcadores A, B y C deben coexistir en el estado patológico y ser fundamentales para la progresión o recidiva de la enfermedad. Además, la presencia de los biomarcadores B y C debe relacionarse de tal manera que la presencia de uno facilita la ausencia del otro. Esta combinación de biomarcadores permite la determinación de la respuesta celular frente a tratamientos; midiendo simultáneamente el tipo de célula, naturaleza de quimiorresistencia y potencial metastásico (y posiblemente también viabilidad celular), el “ensayo de respuesta basado en células” puede monitorizar con precisión el tratamiento para el cáncer y/o monitorizar la progresión/recidiva de la enfermedad.

40 Pasando ahora a las realizaciones particulares del/de los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento, una realización del/de los mismo(s) se refiere a un ensayo multiplexado para detectar cáncer. Dicho ensayo implica medir simultáneamente: (1) al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa (también denominado en el presente documento biomarcador A) en una muestra biológica de un paciente con cáncer usando una primera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de tipo de célula cancerosa; (2) al menos un biomarcador de quimiorresistencia (también denominado en el presente documento biomarcador C) en la muestra biológica usando una segunda sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de quimiorresistencia; y (3) al menos un biomarcador de potencial metastásico (también denominado en el presente documento biomarcador B) en la muestra biológica usando una tercera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de potencial metastásico. Las al menos tres sondas marcadas con etiqueta se miden a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes.

50 Los ensayos/métodos descritos en el presente documento pueden usarse para detectar un cáncer específico, o los ensayos/métodos pueden ser ensayos generales para todos los tipos de cánceres. Asimismo, el biomarcador de tipo de célula cancerosa usado según el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento puede ser un biomarcador de célula cancerosa no específico, o puede ser específico para un determinado tipo de cáncer. Los ejemplos de cánceres que pueden detectarse/monitorizarse mediante el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, cánceres de pulmón, bronquio, colon, recto, páncreas, próstata, mama, hígado, conducto biliar, vejiga, ovario, cerebro, sistema nervioso central (SNC), riñón, pelvis, cuerpo uterino, cavidad bucal o faringe o melanoma.

Los ejemplos no limitativos de biomarcadores de tipos de células cancerosas no específicos incluyen, pero no se limitan a, citoqueratinas (CK), EpCAM, N-cadherina, E-cadherina y vimentina.

Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las células de carcinoma pueden indicarse mediante citoqueratina (CK) como biomarcador A, y la primera sonda marcada con etiqueta puede comprender múltiples anticuerpos marcados con etiqueta para separar citoqueratinas (tales como, pero sin limitarse a, citoqueratinas 8/18/19). Las citoqueratinas (CK) son proteínas de filamentos intermedios que contienen queratina encontradas en el citoesqueleto intracitoplasmático de tejido epitelial y se refieren a una familia de proteínas estructurales fibrosas. Hay dos tipos fundamentales de citoqueratinas: las citoqueratinas de tipo I ácidas y las citoqueratinas de tipo II básicas o neutras. Las citoqueratinas se encuentran habitualmente en pares que comprenden una citoqueratina de tipo I y una citoqueratina de tipo II. Las citoqueratinas básicas o neutras incluyen (pero no se limitan a) CK1, CK2, CK3, CK4, CK5, CK6, CK7, CK8 y CK9. Las citoqueratinas ácidas incluyen (pero no se limitan a) CK10, CK12, CK 13, CK14, CK16, CK17, CK18, CK19 y CK20.

En otros casos, la molécula de adhesión a células epiteliales (EpCAM) es una proteína que significa la presencia de células epiteliales en un carcinoma. EpCAM también se ha denominado TACSTD1 (transductor de señal de calcio asociado a tumor 1) y CD326 (agrupación de diferenciación 326). Por tanto, los términos "EpCAM", "TACSTD1" y "CD326" se usan en el presente documento de manera intercambiable.

En otros casos, algunas células cancerosas experimentan una transición de epitelial a mesenquimatosa (EMT) que puede estar indicada por un aumento de biomarcadores de células cancerosas tales como, pero sin limitarse a, vimentina y galectina 3, que significan células con una pérdida de anclaje. Alternativamente, determinadas otras células cancerosas experimentan una transición de mesenquimatosa a endotelial (MET) indicada por un aumento de biomarcadores de células cancerosas tales como, pero sin limitarse a, N-cadherina y E-cadherina. Las fases de EMT y MET para células cancerosas significan un cambio del subtipo de células. Es importante detectar tantas células cancerosas como sea posible y conocer adicionalmente sus subtipos para medir la tumorigenicidad completa.

El término "biomarcador de tipo de célula cancerosa" también incluye marcadores que identifican mutaciones genéticas específicas que provocan que se regulen oncoproteínas u oncogenes (ya sean promotores tumorales o supresores tumorales). Estos tipos de biomarcadores de tipos de células cancerosas pueden usarse solos o en combinación con cualquiera de los otros biomarcadores de tipos de células cancerosas descritos anteriormente en el presente documento. Los ejemplos de estos tipos de biomarcadores de tipos de células cancerosas incluyen, pero no se limitan a, HER2/neu, VEGF-165, KRAS, EGFr, WAF, BAX-1, PDGF, Rb, Jagged 1, Notch, VEGF, VEGHR, k-Ras, CAIX, MIB1, MDM, PR, ER, SEL5, SEM1, PI3K, Akt2, twist 1, EML-4, ALK, Braf, DRAFF, c-met, y combinaciones de los mismos. Estas oncoproteínas y oncogenes se usan para dirigir terapias dirigidas basadas en su presencia en/sobre células. Por ejemplo, la presencia de HER2/neu se usa para recetar terapia con herceptina; sin embargo, HER2/neu, como con otros marcadores de oncoproteínas/oncogenes, con frecuencia sólo se expresa en una fracción de células cancerosas, y no todos los pacientes tienen la mutación genética específica que conduce al biomarcador. La expresión positiva para HER2/neu sólo está presente en el 10-20% de las pacientes con cáncer de mama, e incluso en las pacientes positivas para HER2/neu, el marcador sólo está presente en aproximadamente el 30% de sus células tumorales circulantes. Por tanto, con frecuencia estos marcadores se miden en combinación con otro biomarcador de tipo de célula cancerosa.

En otros casos, las células de carcinoma pueden indicarse mediante un marcador específico de tejido. Por ejemplo, el antígeno específico de próstata (PSA) es una proteína que significa la presencia de células de la glándula prostática. Los ejemplos no limitativos de biomarcadores de tipos de células cancerosas específicos incluyen, pero no se limitan a: antígeno específico de próstata (PSA) o antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) pueden usarse para detectar células de cáncer de próstata; MUC1, CA 15-3 y CA 27-29 pueden usarse para detectar células de cáncer de mama; antígeno carcinoembrionario (CEA), CA19-9 o galactosil transferasa II pueden usarse para detectar células de cáncer de colon; MSLN (mesotelina) puede usarse para detectar células de cáncer de páncreas; CA 125 o receptor de hormona estimulante del foliculo (FSH) pueden usarse para detectar células de cáncer de ovarios; alfa-fetoproteína puede usarse para detectar células de cáncer de hígado; Melan-A (MLANA), tirosinasa (TYR), CSPG4, o MITF pueden usarse para detectar células de cáncer de melanoma; y proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHP) o TSHR pueden usarse para detectar células de cáncer de tiroides.

Según el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento puede usarse cualquier biomarcador de potencial metastásico conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento. La tercera sonda marcada con etiqueta puede ser cualquier sonda que puede detectar dicho biomarcador de potencial metastásico; por ejemplo, pero no a modo de limitación, la tercera sonda marcada con etiqueta puede ser uno o más anticuerpos marcados con etiqueta frente a cualquiera de los marcadores de invasividad de células tumorales indicados a continuación. En algunos casos, el biomarcador de potencial metastásico puede medirse como razón de uno de los biomarcadores indicados a continuación con respecto al biomarcador de tipo de célula cancerosa. Los ejemplos no limitativos particulares de biomarcadores de potencial metastásico que pueden usarse según el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento incluyen un(os) marcador(es) de invasividad de células tumorales en los que el marcador mide la invasión de células cancerosas al interior de la membrana extracelular mediante acontecimientos proteolíticos, tales como activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1), CD95, serina proteasas tales como plasmina, ADAM, y otros; inhibidores de serina proteasa tales como bikunina; metaloproteinasas de matriz tales como MMP9; inhibidores de metaloproteinasas de matriz tales como TIMP-1; y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un ensayo de cáncer de próstata puede

medir PSA como biomarcador de tipo de célula cancerosa, y medir una razón de PAI-1/PSA para determinar el potencial metastásico.

Según el/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento puede usarse cualquier biomarcador de quimiorresistencia conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento. En determinadas realizaciones, el biomarcador de quimiorresistencia es un biomarcador que detecta la prevención de muerte celular (apoptosis), por ejemplo, pero no a modo de limitación, una detección de la presencia de un biomarcador de célula madre cancerosa, tal como, pero sin limitarse a, PL2L de tipo piwi, ADLH, β -integrina, $\alpha 6$ integrina, c-kit, c-met, LIF-R, CXCR4, ESA, CD 20, CD44, CD133, CK5, TRAF2 y transportadores ABC. En otro ejemplo no limitativo, las células cancerosas que contienen CD44 pero carecen de CD24 son indicativas de un fenotipo de célula madre cancerosa. Además, células cancerosas que carecen de CD45 y CD31 pero contienen CD34 son indicativas de una célula madre cancerosa. Además, células cancerosas que contienen CD44 y CD24 así como ESA son indicativas de una célula madre cancerosa. Además, la presencia tanto de CD24 como de ESA es indicativa de una célula madre cancerosa. Las células madre somáticas en carcinomas de tumores sólidos pueden convertirse en células madre cancerosas. Otras células cancerosas resistentes a la apoptosis inducida por CD95 son quimiorresistentes. Las células madre cancerosas son de naturaleza quimiorresistente, y contienen una capacidad de autorrenovación (divisiones asimétricas) así como son capaces de diferenciación para dar una jerarquía de células de progenie para formar un tumor. La autorrenovación de células madre cancerosas se activa mediante las rutas de señalización de células madre (Wnt, Sonic Hedgehog y Notch) y a nivel epigenético mediante gen de Polcomb (BMI-1 y EZH2). Esta autorrenovación se produce a costa de rutas de señalización de apoptosis (caspasa 3, 5, 8, p53). Medir biomarcadores de células madre cancerosas y combinaciones de los mismos como indicación de quimiorresistencia proporciona una medida de (a) resistencia a fármacos, (b) la incapacidad de activar la apoptosis, y/o (c) la incapacidad de desactivar la autorrenovación.

Las sondas descritas y reivindicadas en el presente documento pueden marcarse con etiqueta mediante cualquier método conocido en la técnica o contemplado de otro modo en el presente documento. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, las etiquetas de las sondas marcadas con etiqueta primera, segundo y tercera (y cualquier cuarta, quinta, sexta, etc., adicional) pueden seleccionarse de un catálogo exhaustivo de colorantes fluorescentes (luminiscentes). Por ejemplo, pero no a modo de limitación, existe un catálogo exhaustivo en línea en <http://www.fluorophores.org> (cuyo contenido completo se incorpora expresamente en el presente documento como referencia). Este catálogo incluye etiquetas habitualmente usadas tales como 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, sulforodamina 101 (rojo de Texas), 2-[4-(aminoiminometil)fenil]-1H-indol-6-carboximidamida (DAPI), 3H-indolio (Cy5), 1H-benzo[e]indolio (Cy 5,5), 3H-indolio (Cy 7), ALEXA FLUOR®488, ALEXA FLUOR®555, ALEXA FLUOR®647, y combinaciones y derivados de los mismos que se han sintetizado con el fin de proporcionar reactivos mejores. Adicionalmente, pueden usarse metales de las tierras raras y nanopartículas que contienen elementos de las tierras raras como etiquetas.

Las muestras biológicas usadas en los métodos del/de los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento pueden usarse en la forma en la que se obtienen (es decir, muestra tisular), o pueden exponerse a una o más etapas de aislamiento (es decir, aislamiento de células cancerosas a partir de las mismas).

Aunque los ensayos descritos anteriormente en el presente documento describen la medición de tres biomarcadores con tres sondas marcadas con etiqueta, debe entenderse que también pueden medirse uno o más biomarcadores adicionales en el ensayo (usando una o más sondas marcadas con etiqueta adicionales). Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el ensayo puede incluir además medir al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica usando una cuarta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional, medir un segundo biomarcador adicional en la muestra biológica usando una quinta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional, medir un tercer biomarcador adicional en la muestra biológica usando una sexta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional, etc. De manera ideal, se usa un máximo de seis a ocho sondas marcadas con etiqueta; de lo contrario, resulta difícil detectar la totalidad de las sondas marcadas con etiqueta a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes, no solapantes.

Estos biomarcadores adicionales pueden incluir biomarcadores que detectan otras propiedades celulares, específicamente la presencia de núcleos celulares o de membranas celulares intactas, para las células que son positivas para el biomarcador de tipo de célula cancerosa. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la presencia de núcleos celulares puede detectarse usando una sonda de unión a ADN tal como, pero sin limitarse a, DAPI. En otro ejemplo no limitativo, la detección de membranas celulares intactas puede implicar la detección de fosfolípidos aniónicos (tales como, pero sin limitarse a, fosfatidilserina) sobre la superficie de células, y la segunda sonda marcada con etiqueta puede ser bis(cinc²⁺dipicolilamina) y/o PSVue™.

El uno o más biomarcadores adicionales/sondas marcadas con etiqueta también pueden usarse para reducir cualquier resultado falso positivo obtenido con el biomarcador de tipo de célula cancerosa; por ejemplo, pero no a modo de limitación, pueden excluirse glóbulos blancos del ensayo excluyendo células positivas para uno o más marcadores de agrupación de diferenciación (también denominado "agrupación de designación"; con frecuencia abreviado como CD). Por ejemplo, pero no a modo de limitación, pueden usarse marcadores tales como CD45, CTLA-4, CD4, CD68 y/o CD8 presentes sobre glóbulos blancos para indicar que una célula no es una célula

cancerosa. En un ejemplo no limitativo particular, el antígeno CD45 (también conocido como PTPRC, receptor de proteína tirosina fosfatasa de tipo C, y originalmente denominado antígeno común leucocitario (todos ellos términos usados en el presente documento de manera intercambiable)) es útil en la detección de todos los glóbulos blancos. Adicionalmente, puede usarse CD45 para diferenciar los diferentes tipos de glóbulos blancos cuando se combina con otros marcadores de CD. Por ejemplo, los granulocitos se indican mediante CD45+, CD15+; los monocitos se indican mediante CD45+, CD14+; los linfocitos T se indican mediante CD45+, CD3+; las células cooperadoras T se indican mediante CD45+, CD3+, CD4+; las células T citotóxicas se indican mediante CD45+, CD3+, CD8+; los linfocitos B se indican mediante CD45+, CD19+ o CD45+, CD20+; los trombocitos se indican mediante CD45+, CD61+; y los linfocitos citolíticos naturales se indican mediante CD16+, CD56+, CD3-. Adicionalmente, dos moléculas CD usadas habitualmente son CD4 y CD8, que se usan, en general, como marcadores para células T cooperadoras y citotóxicas, respectivamente. Estas moléculas se definen en combinación con CD3+, ya que algunos otros leucocitos también expresan estas moléculas de CD (algunos macrófagos expresan bajos niveles de CD4; las células dendríticas expresan altos niveles de CD8).

El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento también se refiere(n) a un kit que incluye las sondas marcadas con etiqueta primera, segunda y tercera (que se unen a un biomarcador de tipo de célula cancerosa, un biomarcador de quimiorresistencia, y un biomarcador de potencial metastásico, respectivamente) tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento. También pueden incluirse en el kit sondas marcadas con etiqueta adicionales para detectar otros biomarcadores tal como se describió anteriormente de manera adicional en el presente documento. La totalidad de las sondas marcadas con etiqueta presentes en el kit se miden a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes.

El kit también puede incluir medios para aislar células cancerosas a partir de una muestra biológica. Dichos medios se conocen bien en la técnica (véase por ejemplo, Lianidou y Markou, 2011; cuyo contenido completo se incorpora expresamente en el presente documento como referencia); por tanto, no se considera necesaria una discusión adicional de los mismos.

El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento también se refiere(n) a métodos de (1) monitorización del tratamiento para el cáncer en un paciente con cáncer que se somete a dicho tratamiento, y (2) monitorización de la progresión/recidiva de la enfermedad en el paciente con cáncer. En el método de (1) monitorización del tratamiento para el cáncer, se obtiene una primera muestra biológica a partir del paciente antes de la exposición a un tratamiento para el cáncer, y se obtiene una segunda muestra biológica a partir del paciente tras la exposición al tratamiento para el cáncer. En el método de (2) monitorización de la progresión/recidiva de enfermedad, la primera muestra biológica se obtiene a partir del paciente en un primer punto de tiempo, y la segunda muestra biológica se obtiene a partir del paciente en un punto de tiempo posterior. En ambos métodos, después se miden los niveles de un biomarcador de tipo de célula cancerosa (tal como se describió anteriormente en el presente documento), un biomarcador de quimiorresistencia (tal como se describió anteriormente en el presente documento), y un biomarcador de potencial metastásico (tal como se describió anteriormente en el presente documento) usando sondas marcadas con etiqueta primera, segunda y tercera, respectivamente (tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento), en las muestras biológicas primera y segunda. Las células a las que se une la primera sonda marcada con etiqueta se identifican en las muestras biológicas primera y segunda, y después los niveles de (i) el biomarcador de quimiorresistencia y (ii) el marcador de potencial metastásico en las células a las que se une la primera sonda marcada con etiqueta se comparan en las muestras biológicas primera y segunda. Después se determina en el método de (1) que el tratamiento para el cáncer es eficaz si el nivel del biomarcador de quimiorresistencia disminuye y el nivel del biomarcador de potencial metastásico aumenta en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica; alternativamente, después se determina en el método de (2) que el cáncer ha progresado/presentado recidiva si el nivel del biomarcador de quimiorresistencia aumenta y el nivel del biomarcador de potencial metastásico ha disminuido en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica.

Las muestras biológicas usadas en los métodos del/de los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento pueden usarse en la forma en la que se obtienen (es decir, muestra tisular), o pueden exponerse a una o más etapas de aislamiento (es decir, aislamiento de células cancerosas a partir de las mismas).

Aunque los métodos descritos anteriormente en el presente documento describen la medición de tres biomarcadores con tres sondas marcadas con etiqueta, debe entenderse que también pueden incluirse biomarcadores adicionales en los métodos (usando sondas marcadas con etiqueta adicionales). Por ejemplo, pero no a modo de limitación, el método puede incluir además medir al menos un biomarcador adicional en las muestras biológicas primera y segunda usando una cuarta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional, medir un segundo biomarcador adicional en las muestras biológicas primera y segunda usando una quinta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional, medir un tercer biomarcador adicional en las muestras biológicas primera y segunda usando una sexta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional, etc. De manera ideal, se usa un máximo de seis a ocho sondas marcadas con etiqueta; de lo contrario, resulta difícil detectar la totalidad de las sondas marcadas con etiqueta a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes, no solapantes. Cuando se miden biomarcadores adicionales, los métodos también pueden incluir

la etapa de comparar los niveles del biomarcador(es) adicional(es) en las células a las que se une la primera sonda marcada con etiqueta en las muestras biológicas primera y segunda.

Estos biomarcadores adicionales pueden incluir biomarcadores que detectan otras propiedades celulares, específicamente la presencia de núcleos celulares o de membranas celulares intactas, para las células que son positivas para el biomarcador de tipo de célula cancerosa. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, la presencia de núcleos celulares puede detectarse usando una sonda de unión a ADN tal como, pero sin limitarse a, DAPI. En otro ejemplo no limitativo, la detección de membranas celulares intactas puede implicar la detección de fosfolípidos aniónicos (tales como, pero sin limitarse a, fosfatidilserina) sobre la superficie de células, y la segunda sonda marcada con etiqueta puede ser bis(cinc²⁺dipicolilamina) y/o PSVue™.

El uno o más biomarcadores/sondas marcadas con etiqueta adicionales también pueden usarse para reducir cualquier resultado falso positivo obtenido con el biomarcador de tipo de célula cancerosa; por ejemplo, pero no a modo de limitación, pueden excluirse glóbulos blancos de los métodos excluyendo células positivas para uno o más marcadores de agrupación de diferenciación (tal como se describió en detalle anteriormente en el presente documento).

15 Ejemplos

A continuación en el presente documento se proporcionan ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que la presente invención no se limita en cuanto a su aplicación a los experimentos, resultados y procedimientos de laboratorio específicos. En vez de eso, los ejemplos simplemente se proporcionan como una de diversas realizaciones y se pretende que sean a modo de ejemplo, no limitativos.

20 Ejemplo 1 - Ensayo multiplexado para detectar cáncer de mama

El siguiente procedimiento muestra el multiplexado de biomarcadores A (tipo de célula cancerosa), B (potencial metastásico) y C (quimiorresistencia) usando una combinación única de reactivos de afinidad con etiquetas fluorescentes y una etiqueta de afinidad para proporcionar un ensayo multiplexado para detectar cáncer de mama. Esto permite la medición simultánea del tipo de célula cancerosa, la naturaleza de quimiorresistencia y el potencial metastásico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, en combinación con un marcador que indica la presencia de núcleo celular (usando una sonda de unión a ácido nucleico). Los datos demostraron que pueden medirse cuatro señales simultáneas con esta combinación, pero no con las combinaciones tradicionales de la técnica anterior. El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento tiene(n) el potencial de medir hasta ocho señales usando diversos fluoróforos enseñados en el presente documento.

El procedimiento para someter a prueba el método fue extraer 4 ml de sangre completa normal fresca en un tubo de VACUTAINER® (tubo VACUTAINER® K2EDTA de 6 ml de BD, 10,8 mg, ref. 367863, Becton Dickinson, Oakville, ON) y transferir la sangre al interior de un tubo de centrifuga redondo sellado con un tapón. Se añadieron células cancerosas mediante 40 µl de suspensión de células de cáncer de mama para obtener un intervalo de 3000 a 8000 células/ml (8 células/µl o 1-2 por HRP de alto campo de potencia (HRP=0,2 µl)). Se sometió la sangre a lisis añadiendo 3 ml de tampón de lisis (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 20 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,4). Los tubos eran tubos laminados para garantizar que las células estaban distribuidas uniformemente y que la lisis era completa, y después se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 12.000 rpm. A continuación, se decantó el plasma como sobrenadante residual, y se añadieron 4,0 ml de tampón de TES (ácido N-Tris[hidroximetil]-2-aminoetano-sulfónico 50 mM: TES, pH 7,4, NaCl 2150 mM, MgSO₄ 2 mM y KCO₃ 1 mM) y albúmina al 1%, y se balanceó el tubo para mezclar las células. Se centrifugó de nuevo el tubo durante 15 minutos a 12.000 rpm, y se decantó el sobrenadante como residuo. Se añadieron 2,0 ml finales de tampón de lavado de TES con balanceo para mezclar las células.

Después se hicieron reaccionar las células con los reactivos tomando 0,5 ml de sangre lavada en el tubo de centrifuga, y se añadieron 40 µl de anticuerpos para HER2/neu marcados con etiqueta con Cy5 y 40 µl de anticuerpos para activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) o inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1) marcados con etiqueta con rojo de Texas (a una disolución madre de trabajo de 0,001 a 0,1 mg/ml) y PL2L de tipo piwi marcado con etiqueta con FITC (a una disolución madre de trabajo de 0,001 a 0,1 mg/ml). A continuación, se añadieron 10 µl de un diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol 100 µg/ml (DAPI; una sonda de unión a ácido nucleico) a partir de una disolución en tampón de TES. Esto fue seguido por incubación durante 15 minutos a 37°C.

Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 7500 rpm, y se separó el sobrenadante por decantación como residuo (~450 µl). Después se añadieron 500 µl de tampón de TES, y se agitó la muestra con vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 7500 rpm. De nuevo, se separó el sobrenadante por decantación mediante golpes como residuo (~450 µl). Se añadieron 500 µl finales de tampón de lavado de TES para obtención de imágenes finales, y se colocaron 5 µl de la disolución sobre un portaobjetos con un cubreobjetos de vidrio largo. Se llevó a cabo microscopía de contraste de fase y de fluorescencia con el instrumento Leica DM5000 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL). Se tiñó una muestra de células con la sonda PSS-550 (ex. 553, em. 615 nm) y se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 540-580 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 610-680 nm para determinar el derrumbamiento de la membrana celular como medida de muerte celular además de recuentos de células.

La etiqueta rojo de Texas (ex. 592, em. 614 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 540-580 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 610-680 nm. La etiqueta FITC (ex. 488, em. 525 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 460 - 500 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 512 -543 nm. La sonda DAPI (ex. 355, em. 460 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 340-380 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 450-490 nm. La etiqueta Cy5 (ex. 646, em. 676 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 590-650 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 665-735 nm.

Se demostró el multiplexado ideal mediante combinación de las nanopartículas de tierras raras con FITC, rojo de Texas, Cy5 y DAPI. La nanopartícula de europio (ex. 355, em. 617 nm) se midió a un filtro de paso de banda de excitación a 340-380 nm y filtro de paso largo de emisión de > 590 nm. Fue posible la medición simultánea de biomarcadores para tipo de célula cancerosa, potencial metastásico y quimiorresistencia, junto con un biomarcador que indica la presencia de núcleos celulares, junto con la eliminación de falsos positivos (es decir, glóbulos blancos) mediante detección de la presencia del biomarcador CD45. Los datos actuales permiten cinco señales. Sin embargo, los ensayos/métodos descritos y reivindicados en el presente documento tienen el potencial de detección y medición de seis señales/biomarcadores, si las nanopartículas de tierras raras pueden multiplexarse para dar tres señales de emisión diferentes. La etiqueta de europio aumentó en gran medida la señal con respecto a FITC y rojo de Texas en 2-3 órdenes de magnitud.

Ejemplo 2 - Ensayo de respuesta celular para detectar cáncer de mama

Se desarrolló un ensayo de respuesta celular novedoso para detectar cáncer de mama usando HER2/neu como marcador de tipo de tejido para detectar cáncer de mama de carcinoma (biomarcador A) que siempre está presente en el estado patológico. El biomarcador B para potencial metastásico usó antígeno uPA y PAI; estos son marcadores de invasividad tumoral y están presentes en la diferenciación y crecimiento de células cancerosas agresivas y aumentan con el potencial de invasividad metastásica de las células. El biomarcador C para quimiorresistencia usó antígeno PL2L de tipo piwi (véase por ejemplo, Gao *et al.*, 2008).

Se usó el procedimiento mostrado en el ejemplo 1 para medir células cancerosas antes y después del tratamiento con y sin camptotecina. Se sabe que la camptotecina activa la apoptosis en células cancerosas y destruye células cancerosas como un agente quimioterápico (véase Gupta, 1997). Se sometieron a prueba células mediante el ensayo de respuesta celular y mediante un ensayo de la técnica anterior tradicional. El "ensayo de respuesta celular" novedoso usó HER2/neu como biomarcador A para tipo de célula, los marcadores de invasividad tumoral uPA y PAI-1 como biomarcador B para potencial metastásico, y el marcador de célula madre cancerosa PL2L de tipo piwi como biomarcador C para naturaleza de quimiorresistencia. El ensayo tradicional usó EpCAM como marcador para tipo de tejido epitelial y citoqueratina (CK) como marcador de células de origen canceroso. Adicionalmente, se usó CD45, un marcador para glóbulos blancos, para detectar resultados falsos, excluyéndose resultados positivos para CD45 del análisis. Tanto el ensayo tradicional como de respuesta celular usaron DAPI para determinar la presencia de núcleos celulares.

Pudo ajustarse la concentración de camptotecina para ser suficiente para destruir >80%, 60% y 40% de las células cancerosas en cultivos. El análisis celular mostró que el recuento de células cancerosas disminuía a medida que aumentaba el % de muerte celular y aumentaba el derrumbamiento de fosfatidilserina. El análisis celular mostró que el biomarcador B, concretamente uPA y PA1, aumentaba (o se detectó en un mayor número de células cancerosas) cuando el % de muerte celular era el más alto. El análisis celular mostró que el biomarcador C, concretamente PL2L de tipo piwi, disminuía (o se detectó en un menor número de células cancerosas) cuando el % de muerte celular era el más alto. Los tres biomarcadores coexisten en el estado patológico y eran fundamentales para la progresión o recidiva de la enfermedad. Este análisis de la combinación específica de biomarcadores descritos y reivindicados en el presente documento permite la determinación de la respuesta celular frente a tratamientos midiendo simultáneamente el tipo de célula cancerosa, la naturaleza de quimiorresistencia y el potencial metastásico (con o sin la medición adicional de viabilidad celular), y en el presente documento se denomina "ensayo de respuesta basado en células".

En cambio, en el ensayo tradicional, el biomarcador CD45 no coexiste con EpCAM y CK. Tanto EpCAM como CK estaban presentes en todas las células independientemente del % de células que se destruyeron.

Ejemplo 3 - Ensayo multiplexado para detectar cáncer de próstata

El siguiente procedimiento muestra el multiplexado de los biomarcadores A (tipo de célula cancerosa), B (potencial metastásico) y C (quimiorresistencia) usando una combinación única de reactivos de afinidad con etiquetas fluorescentes y una etiqueta de afinidad para proporcionar un ensayo multiplexado para detectar cáncer de próstata. Esto permite la medición simultánea del tipo de célula cancerosa, la naturaleza de quimiorresistencia y el potencial metastásico, tal como se describió anteriormente en el presente documento, en combinación con un marcador que indica la presencia de núcleos celulares (usando una sonda de unión a ácido nucleico). Los datos demostraron que pueden medirse cuatro señales simultáneas con esta combinación, pero no con las combinaciones tradicionales de la técnica anterior. El/los concepto(s) inventivo(s) dado(s) a conocer y reivindicado(s) en el presente documento tiene(n) el potencial de medir hasta ocho señales usando diversos fluoróforos enseñados en el presente documento.

El procedimiento para someter a prueba el método fue extraer 4 ml de sangre completa normal fresca en un tubo de VACUTAINER® (tubo VACUTAINER® K2EDTA de 6 ml de BD, 10,8 mg, ref. 367863, Becton Dickinson, Oakville, ON) y transferir la sangre al interior de un tubo de centrifuga redondo sellado con un tapón. Se añadieron células cancerosas mediante 40 μ l de suspensión de células de cáncer de próstata para obtener un intervalo de 3000 a 8000 células/ml (8 células/ μ l o 1-2 por HRP de alto campo de potencia (HRP=0,2 μ l)). Se sometió la sangre a lisis añadiendo 3 ml de tampón de lisis (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 20 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7,4). Los tubos eran tubos laminados para garantizar que las células estaban distribuidas uniformemente y que la lisis era completa, y después se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 12.000 rpm. A continuación, se decantó el plasma como sobrenadante residual, y se añadieron 4,0 ml de tampón de TES (ácido N-Tris[hidroximetil]-2-aminoetano-sulfónico 50 mM: TES, pH 7,4, NaCl 2150 mM, MgSO₄ 2 mM y KCO₃ 1 mM) y albúmina al 1%, y se balanceó el tubo para mezclar las células. Se centrifugó de nuevo el tubo durante 15 minutos a 12.000 rpm, y se decantó el sobrenadante como residuo. Se añadieron 2,0 ml finales de tampón de lavado de TES con balanceo para mezclar las células.

Después se hicieron reaccionar las células con los reactivos tomando 0,5 ml de sangre lavada en el tubo de centrifuga, y se añadieron 40 μ l de anticuerpos para PSA marcados con etiqueta con Cy5 y 40 μ l de anticuerpos para activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) o inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1) marcados con etiqueta con rojo de Texas (a una disolución madre de trabajo de 0,001 a 0,1 mg/ml) y PL2L de tipo piwi marcado con etiqueta con FITC (a una disolución madre de trabajo de 0,001 a 0,1 mg/ml). A continuación, se añadieron 10 μ l de un diclorhidrato de 4,6-diamidino-2-fenilindol 100 μ g/ml (DAPI; una sonda de unión a ácido nucleico) a partir de una disolución en tampón de TES. Esto fue seguido por incubación durante 15 minutos a 37°C.

Se centrifugó la muestra durante 5 minutos a 7500 rpm, y se separó el sobrenadante por decantación como residuo (~450 μ l). Después se añadieron 500 μ l de tampón de TES, y se agitó la muestra con vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 7500 rpm. De nuevo, se separó el sobrenadante por decantación mediante golpes como residuo (~450 μ l). Se añadieron 500 μ l finales de tampón de lavado de TES para obtención de imágenes finales, y se colocaron 5 μ l de la disolución sobre un portaobjetos con un cubreobjetos de vidrio largo. Se llevó a cabo microscopía de contraste de fase y de fluorescencia con el instrumento Leica DM5000 (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL).

La etiqueta rojo de Texas (ex. 592, em. 614 nm) se midió con n filtro de paso de banda de excitación a 540-580 nm y filtro de paso de banda de emisión a 610-680 nm. La etiqueta FITC (ex. 488, em. 525 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 460 - 500 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 512 -543 nm. La sonda DAPI (ex. 355, em. 460 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 340-380 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 450-490 nm. La etiqueta Cy5 (ex. 646, em. 676 nm) se midió con un filtro de paso de banda de excitación a 590-650 nm y un filtro de paso de banda de emisión a 665-735 nm.

Se demostró el multiplexado ideal mediante combinación de las nanopartículas de tierras raras con FITC, rojo de Texas, Cy5 y DAPI. La nanopartícula de europio (ex. 355, em. 617 nm) se midió a un filtro de paso de banda de excitación a 340-380 nm y filtro de paso largo de emisión de > 590 nm. Fue posible la medición simultánea de biomarcadores para tipo de célula cancerosa, potencial metastásico y quimiorresistencia, junto con un biomarcador que indica la presencia de núcleos celulares, junto con la eliminación de falsos positivos (es decir, glóbulos blancos) mediante detección de la presencia del biomarcador CD45. Los datos actuales permiten cinco señales. Sin embargo, los ensayos/métodos descritos y reivindicados en el presente documento tienen el potencial de detección y medición de seis señales/biomarcadores, si las nanopartículas de tierras raras pueden multiplexarse para dar tres señales de emisión diferentes. La etiqueta de europio aumentó en gran medida la señal con respecto a FITC y rojo de Texas en 2-3 órdenes de magnitud.

Ejemplo 4 - Ensayo de respuesta celular para detectar cáncer de próstata

La proteasa, al igual que la plasmina, se expresa durante la metástasis de células malignas como parte del proceso de fibrinólisis y regeneración tisular, fomentando indirectamente la proliferación célula. Las células cancerosas usan plasmina unida a célula para activar la señalización de plasminógeno para urocinasa. Los inhibidores de plasmina tales como bikunina y los inhibidores de activación del plasminógeno tales como PAI-1 evitan la activación de plasmina unida a célula y suprimen la invasividad tumoral.

Se desarrolló un ensayo de respuesta celular novedoso para detectar cáncer de próstata usando PSA como marcador de tipo de tejido para detectar carcinoma de próstata (biomarcador A) que siempre está presente en el estado patológico. Los marcadores usados en este ejemplo para potencial metastásico (biomarcador B) fueron activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA) e inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1), que es una medida de la invasividad tisular y está presente en una diferenciación y crecimiento de células cancerosas agresivas con potencial de invasividad metastásica aumentado. La naturaleza de quimiorresistencia (biomarcador C) se determinó usando antígeno PL2L de tipo piwi para determinar la respuesta inhibidora frente a la invasividad tisular.

Se usó el procedimiento mostrado en el ejemplo 3 para medir células de cáncer de próstata antes y después del tratamiento con y sin camptotecina. Se sabe que la camptotecina activa la apoptosis en células cancerosas y destruye células cancerosas como un agente quimioterápico (véase Gupta, 1997). Se sometieron a prueba células mediante el ensayo de respuesta celular y mediante un ensayo de la técnica anterior tradicional. El "ensayo de respuesta celular" novedoso usó PSA como biomarcador A para tipo de célula, los marcadores de invasividad

5 tumoral uPA y PAI-1 como biomarcador B para potencial metastásico, y el marcador de células madre cancerosas PL2L de tipo piwi como biomarcador C para naturaleza de quimiorresistencia. El ensayo tradicional usó EpCAM como marcador para tipo de tejido epitelial y citoqueratina (CK) como marcador de células de origen canceroso. Adicionalmente, se usó CD45, un marcador para glóbulos blancos, para detectar resultados falsos, excluyéndose resultados positivos para CD45 del análisis. Tanto el ensayo tradicional como de respuesta celular usaron DAPI para determinar la presencia de núcleos celulares.

10 Pudo ajustarse la concentración de camptotecina para ser suficiente para destruir >80%, 60% y 40% de las células cancerosas en cultivos. El análisis celular mostró que el recuento de células cancerosas disminuía a medida que aumentaba el % de muerte celular y aumentaba el derrumbamiento de fosfatidilserina. El análisis celular mostró que el biomarcador B, concretamente uPA y PA1, aumentaba (o se detectó en un mayor número de células cancerosas) cuando el % de muerte celular era el más alto. El análisis celular mostró que el biomarcador C, concretamente PL2L de tipo piwi, disminuía (o se detectó en un menor número de células cancerosas) cuando el % de muerte celular era el más alto. Los tres biomarcadores coexisten en el estado patológico y eran fundamentales para la progresión o recidiva de la enfermedad. Este análisis de la combinación específica de biomarcadores descritos y reivindicados en el presente documento permite la determinación de la respuesta celular frente a tratamientos midiendo simultáneamente el tipo de célula cancerosa, la naturaleza de quimiorresistencia y el potencial metastásico (con o sin la medición adicional de viabilidad celular), y en el presente documento se denomina "ensayo de respuesta basado en células".

20 En cambio, en el ensayo tradicional, el biomarcador CD45 no coexiste con EpCAM y CK. Tanto EpCAM como CK estaban presentes en todas las células independientemente del % de células que se destruyeron.

Ejemplo 5

25 El siguiente procedimiento demuestra el multiplexado de los biomarcadores A, B y C tal como se describió anteriormente en el presente documento para proporcionar un ensayo general para todos los tipos de cánceres. Este procedimiento se realiza tal como se describió anteriormente en el presente documento en los ejemplos 1/3, excepto por lo siguiente: (a) la suspensión cancerosa añadida al procedimiento se selecciona de una de las siguientes líneas celulares, SKBR, MCF o MDA (cáncer de mama), UC3 o T24 (cáncer de vejiga), PC3-9 (cáncer de próstata), y A549 (cáncer de pulmón); y (b) se usa el biomarcador de célula cancerosa no específico, citoqueratina, para biomarcador A. En este ejemplo particular, se usan anticuerpos frente a las citoqueratinas 8/18/19 (en el que dichos anticuerpos están marcados con etiqueta con Cy5) como primera sonda marcada con etiqueta que se une al biomarcador A. Tal como se describe en los ejemplos 1 y 3, se usan anticuerpos frente a uPA o PAI-1 marcados con etiqueta con rojo de Texas como segunda sonda marcada con etiqueta que se une al biomarcador B, y se usan anticuerpos frente a PL2L de tipo piwi marcados con etiqueta con FITC como tercera sonda marcada con etiqueta que se une al biomarcador C. También se usa la sonda de unión a ácido nucleico DAPI tal como se describió en los ejemplos 1 y 3.

35 Este ensayo multiplexado que usa un biomarcador de célula cancerosa no específico permite adaptar los ensayos/métodos descritos en el presente documento para su uso con todos los tipos de cánceres.

40 Por tanto, según la presente invención, se ha proporcionado un ensayo de respuesta celular, así como métodos de producción y uso del mismo, que satisface completamente los objetivos y las ventajas expuestos anteriormente en el presente documento. Aunque se ha descrito la invención junto con los dibujos, experimentos, resultados y términos específicos expuestos anteriormente en el presente documento, resulta evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Ensayo de respuesta celular para detectar cáncer, que comprende las etapas de:
- aislar células cancerosas a partir de una muestra biológica de un paciente con cáncer;
 - medir al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa sobre la superficie o dentro de la célula usando una primera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de tipo de célula cancerosa, en el que el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de:
 - (a) una combinación de al menos una citoqueratina de tipo I y al menos una citoqueratina de tipo II;
 - (b) una combinación de vimentina y galectina 3; y
 - (c) una combinación de N-cadherina y E-cadherina; o
 - (d) una oncoproteína/oncogén seleccionado del grupo que consiste en HER2/neu, VEGF-165, KRAS, EGFr, WAF, BAX-1, PDGF, Rb, Jagged 1, Notch, VEGF, VEGHR, k-Ras, CAIX, MIB1, MDM, PR, ER, SEL5, SEM1, PI3K, Akt2, twist 1, EML-4, ALK, Braf, DRAFF, c-met, y combinaciones de los mismos;
 - medir al menos un biomarcador de quimiorresistencia sobre la superficie o dentro de la célula usando una segunda sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de quimiorresistencia, en el que el al menos un biomarcador de quimiorresistencia se selecciona del grupo que consiste en PL2L de tipo piwi, ADLH, b-integrina, a6 integrina, c-kit, c-met, LIF-R, CXCR4, ESA, CD 20, CD44, CD133, CK5, TRAF2, transportadores ABC y combinaciones de los mismos;
 - medir al menos un biomarcador de potencial metastásico sobre la superficie o dentro de la célula usando una tercera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de potencial metastásico, en el que el al menos un biomarcador de potencial metastásico se selecciona del grupo que consiste en
 - activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1), CD95, una serina proteasa, un inhibidor de serina proteasa, una metaloproteinasa de matriz, un inhibidor de metaloproteinasa de matriz, y combinaciones de los mismos; y
- en el que las al menos tres sondas marcadas con etiqueta se miden a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes.
2. Ensayo según la reivindicación 1, en el que el ensayo es para detectar un cáncer seleccionado del grupo que consiste en pulmón, bronquio, colon, recto, páncreas, próstata, mama, hígado, conducto biliar, vejiga, ovario, cerebro, sistema nervioso central (SNC), riñón, pelvis, cuerpo uterino, cavidad bucal, faringe, melanoma, y combinaciones de los mismos.
3. Ensayo según la reivindicación 1, en el que al menos uno de:
- (a) el ensayo es para detectar cáncer de próstata, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) y combinaciones de los mismos;
 - (b) el ensayo es para detectar cáncer de mama, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de MUC1, CA 15-3, CA 27-29 y combinaciones de los mismos;
 - (c) el ensayo es para detectar cáncer de colon, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de antígeno carcinoembrionario (CEA), CA19-9, galactosil transferasa II y combinaciones de los mismos;
 - (d) el ensayo es para detectar cáncer de páncreas, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende MSLN (mesotelina);
 - (e) el ensayo es para detectar cáncer de ovarios, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de CA 125, receptor de hormona estimulante del folículo (FSH) y combinaciones de los mismos;
 - (f) el ensayo es para detectar cáncer de hígado, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende alfa-fetoproteína;
 - (g) el ensayo es para detectar melanoma, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de Melan-A (MLANA), tirosinasa (TYR), CSPG4, MITF y combinaciones de los mismos; y

- (h) el ensayo es para detectar cáncer de tiroides, y el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), TSHR y combinaciones de los mismos.
- 5 4. Ensayo según la reivindicación 1, en el que el al menos un biomarcador de quimiorresistencia comprende al menos uno de:
- (a) presencia de CD44 y ausencia de CD24;
 - (b) presencia de CD34 y ausencia de CD45 y CD31;
 - (c) presencia de CD44, CD24 y ESA; y
 - (d) presencia de CD24 y ESA.
- 10 5. Ensayo según la reivindicación 1, en el que al menos uno de:
- (a) la serina proteasa se selecciona del grupo que consiste en plasmina, ADAM, y combinaciones de los mismos;
 - (b) el inhibidor de serina proteasa comprende bikunina;
 - (c) la metaloproteinasas de matriz comprende MMP9; y
 - (d) los inhibidores de metaloproteinasas de matriz comprenden TIMP-1.
- 15 6. Ensayo según la reivindicación 1, en el que al menos una de las sondas marcadas con etiqueta primera, segunda y tercera comprende al menos un anticuerpo marcado con etiqueta frente a un biomarcador.
7. Ensayo según la reivindicación 1, en el que las etiquetas de las sondas marcadas con etiqueta primera, segunda y tercera se seleccionan del grupo que consiste en
- 20 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina, sulforodamina 101 (rojo de Texas), 2-[4-(aminoiminometil)fenil]-1H-indol-6-carboximidamida (DAPI), 3H-indolio (Cy5), 1H-benzo[e]indolio (Cy 5,5), 3H-indolio (Cy 7), ALEXA FLUOR®488, ALEXA FLUOR®555, ALEXA FLUOR®647, metales de las tierras raras, nanopartículas que contienen elementos de las tierras raras, y combinaciones y derivados de los mismos.
8. Ensayo según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se define adicionalmente como una muestra tisular.
- 25 9. Ensayo según la reivindicación 1, que comprende además medir al menos un biomarcador adicional en la muestra biológica usando una cuarta sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador adicional.
10. Ensayo según la reivindicación 9, en el que el al menos un biomarcador adicional comprende al menos un biomarcador de glóbulos blancos seleccionado del grupo que consiste en
- CD45, CTLA-4, CD4, CD68, CD8, y combinaciones de los mismos,
- 30 y en el que el ensayo comprende además la etapa de excluir células positivas para al menos un biomarcador de glóbulos blancos.
11. Ensayo según la reivindicación 9, en el que el al menos un biomarcador adicional comprende un biomarcador que indica la presencia de núcleos celulares, y en el que la cuarta sonda marcada con etiqueta comprende diclorhidrato de 4',6-diamidino-2'-fenilindol (DAPI).
- 35 12. Ensayo según la reivindicación 9, en el que el al menos un biomarcador adicional comprende fosfatidilserina, y en el que la cuarta sonda marcada con etiqueta comprende al menos uno de bis(cinc²⁺dipicolilamina) y PSVue™.
13. Método de monitorización de tratamiento para el cáncer en un paciente con cáncer que se somete a dicho tratamiento, comprendiendo el método las etapas de:
- 40 - medir los niveles de un biomarcador de tipo de célula cancerosa en una primera muestra biológica y en una segunda muestra biológica usando una primera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de tipo de célula cancerosa, en el que la primera muestra biológica se obtiene a partir del paciente antes de la exposición a un tratamiento para el cáncer, y en el que la segunda muestra biológica se obtiene a partir del paciente tras la exposición al tratamiento para el cáncer, en el que el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de:
- 45 (a) una combinación de al menos una citoqueratina de tipo I y al menos una citoqueratina de tipo II;
- (b) una combinación de vimentina y galectina 3; y

(c) una combinación de N-cadherina y E-cadherina; o

(d) una oncoproteína/oncogén seleccionado del grupo que consiste en HER2/neu, VEGF- 165, KRAS, EGFr, WAF, BAX-1, PDGF, Rb, Jagged 1, Notch, VEGF, VEGHR, k-Ras, CAIX, MIB1, MDM, PR, ER, SEL5, SEM1, PI3K, Akt2, twist 1, EML-4, ALK, Braf, DRAFF, c-met, y combinaciones de los mismos;

5 - medir los niveles de un biomarcador de quimiorresistencia en las muestras biológicas primera y segunda usando una segunda sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de quimiorresistencia, en el que el al menos un biomarcador de quimiorresistencia se selecciona del grupo que consiste en PL2L de tipo piwi, ADLH, b-integrina, a6 integrina, c-kit, c-met, LIF-R, CXCR4, ESA, CD 20, CD44, CD133, CK5, TRAF2, transportadores ABC y combinaciones de los mismos;

10 - medir los niveles de un biomarcador de potencial metastásico en las muestras biológicas primera y segunda usando una tercera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de potencial metastásico, en el que el al menos un biomarcador de potencial metastásico se selecciona del grupo que consiste en

15 - activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1), CD95, una serina proteasa, un inhibidor de serina proteasa, una metaloproteinasa de matriz, un inhibidor de metaloproteinasa de matriz, y combinaciones de los mismos

y en el que las al menos tres sondas marcadas con etiqueta se miden a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes;

- comparar los niveles del biomarcador de quimiorresistencia en las células a las que se une la segunda sonda marcada con etiqueta en las muestras biológicas primera y segunda;

20 - comparar los niveles del biomarcador de potencial metastásico en las células a las que se une tercera sonda marcada con etiqueta en las muestras biológicas primera y segunda; y

- determinar que el tratamiento para el cáncer es eficaz si el nivel del biomarcador de quimiorresistencia disminuye y el nivel del biomarcador de potencial metastásico aumenta en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica.

25 14. Método de monitorización de progresión/recidiva de cáncer en un paciente con cáncer, comprendiendo el método las etapas de:

30 - medir los niveles de un biomarcador de tipo de célula cancerosa en una primera muestra biológica y en una segunda muestra biológica usando una primera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de tipo de célula cancerosa, en el que la primera muestra biológica se obtiene a partir del paciente en un primer punto de tiempo, y la segunda muestra biológica se obtiene a partir del paciente en un punto de tiempo posterior, en el que el al menos un biomarcador de tipo de célula cancerosa comprende al menos uno de:

(a) una combinación de al menos una citoqueratina de tipo I y al menos una citoqueratina de tipo II;

(b) una combinación de vimentina y galectina 3; y

(c) una combinación de N-cadherina y E-cadherina; o

35 (d) una oncoproteína/oncogén seleccionado del grupo que consiste en HER2/neu, VEGF-165, KRAS, EGFr, WAF, BAX-1, PDGF, Rb, Jagged 1, Notch, VEGF, VEGHR, k-Ras, CAIX, MIB1, MDM, PR, ER, SEL5, SEM1, PI3K, Akt2, twist 1, EML-4, ALK, Braf, DRAFF, c-met, y combinaciones de los mismos;

40 - medir los niveles de un biomarcador de quimiorresistencia en las muestras biológicas primera y segunda usando una segunda sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de quimiorresistencia, en el que el al menos un biomarcador de quimiorresistencia se selecciona del grupo que consiste en PL2L de tipo piwi, ADLH, b-integrina, a6 integrina, c-kit, c-met, LIF-R, CXCR4, ESA, CD 20, CD44, CD133, CK5, TRAF2, transportadores ABC y combinaciones de los mismos;

45 - medir los niveles de un biomarcador de potencial metastásico en las muestras biológicas primera y segunda usando una tercera sonda marcada con etiqueta que se une a dicho biomarcador de potencial metastásico, en el que el al menos un biomarcador de potencial metastásico se selecciona del grupo que consiste en

- activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPA), inhibidor de activador del plasminógeno (PAI-1), CD95, una serina proteasa, un inhibidor de serina proteasa, una metaloproteinasa de matriz, un inhibidor de metaloproteinasa de matriz, y combinaciones de los mismos

50 y en el que las al menos tres sondas marcadas con etiqueta se miden a longitudes de onda de excitación y de emisión diferentes;

ES 2 754 304 T3

- comparar los niveles del biomarcador de quimiorresistencia en las células a las que se une la segunda sonda marcada con etiqueta en las muestras biológicas primera y segunda;
 - comparar los niveles del biomarcador de potencial metastásico en las células a las que se une tercera sonda marcada con etiqueta en las muestras biológicas primera y segunda; y
- 5 - determinar que el cáncer ha progresado/presentado recidiva si el nivel del biomarcador de quimiorresistencia aumenta y el nivel del biomarcador de potencial metastásico disminuye en la segunda muestra biológica en comparación con la primera muestra biológica.

FIGURA 1
Ensayo de respuesta celular

