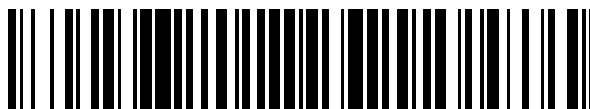


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 456**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/542 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012** **E 12759331 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2751562**

54 Título: **Perfilado de proteínas de ruta de señal para determinar una eficacia terapéutica**

30 Prioridad:

02.09.2011 US 201161530621 P

28.10.2011 US 201161553124 P

21.11.2011 US 201161562338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
09.12.2015

73 Titular/es:

NESTEC S.A. (100.0%)

Avenue Nestlé 55

1800 Vevey, CH

72 Inventor/es:

SINGH, SHARAT y

KIM, PHILLIP

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 553 456 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

Perfilado de proteínas de ruta de señal para determinar una eficacia terapéutica

5 Antecedentes de la invención

Las rutas de transducción de señales que actúan como mediadoras el crecimiento y la supervivencia celular, son dianas para la terapia contra el cáncer, ya que la tumorogénesis a menudo implica rutas de transducción de señales que funcionan mal. Las anomalías que se producen en la señalización hacen que las células cancerosas aumenten su potencial de crecimiento y la capacidad de evitar la apoptosis inducida por agentes que producen daños al ADN.

Una ruta de transducción de señal bien caracterizada es la ruta de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), que interviene en diversos procesos celulares, por ejemplo, transformación maligna, señalización de factores de crecimiento, inflamación e inmunidad. La enzima se identificó originalmente como una actividad asociada con oncoproteínas virales y con receptores tirosina quinasa de factores de crecimiento que fosforilan la fosfatidilinositol (PI) y sus derivados fosforilados en el hidroxilo 3' del anillo inositol. Las fosfoinositida 3-quinasas (PI3K) son quinastas lipídicas que fosforilan lípidos en el resto 3-hidroxilo del anillo inositol. Los 3 fosfolípidos fosforilados (PIP3) generados por las PI3-quinastas actúan como segundos mensajeros reclutando quinastas con dominios de unión lipídicos, tales como la AKT y la quinasa 1 dependiente de fosfoinositido (PDK1).

Las PI3 quinastas de clase I son heterodímeros compuestos por 2 subunidades: una subunidad catalítica de 110 kDa (p110) y una subunidad reguladora de 85 kDa (p85). La subunidad reguladora contiene dominios SH2 y se une a restos de tirosina fosforilados mediante receptores de factores de crecimiento con una actividad de tirosina quinasa o de productos oncogénicos, induciendo de este modo la actividad PI3K de la subunidad catalítica p110, que a su vez fosforila su sustrato lipídico.

Las PI3 quinastas de clase I intervienen en importantes acontecimientos de transducción de señales aguas abajo de citocinas, integrinas, factores de crecimiento e inmunorreceptores, lo que sugiere que el control de esta ruta puede conducir a importantes efectos terapéuticos, tales como, modulación de la proliferación celular y carcinogénesis. La activación de las PI3 quinastas de clase I se inicia cuando un factor de crecimiento o un ligando se une a su receptor tirosina quinasa (RTK) afín. Estos receptores incluyen elementos de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico humano (HER, EGFR o ErbB), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés), receptores de insulina y del factor 1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1, por sus siglas en inglés). La dimerización y fosforilación posterior de RTK permiten que el heterodímero de PI3K se una directamente a los RTK y/o a las proteínas adaptadoras activadas. La PI3K activada cataliza la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P2 o PIP2) a fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (P(3,4,5)P3 o PIP3). PIP3 facilita la fosforilación de AKT que es el efector central de la ruta PI3K. La AKT transmite señales a un hospedador de sustratos aguas abajo, controlando esto una variedad de funciones celulares clave, incluyendo crecimiento, metabolismo, proliferación y supervivencia.

La cooptación inapropiada de la ruta PI3K normalmente ocurre en cáncer humano. Frecuentemente la ruta PI3K está hiperactivada en cáncer de mama, así como en otros tipos de tumores. Se ha demostrado que el 70 % de los cánceres de mama tienen una ruta PI3K mal regulada (Lopez-Knowles *et al.* Int. J. Cancer, 126,1121-1131 (2010)). Se ha establecido bien que las mutaciones en el gen de PIK3CA (que codifica la subunidad p110 de PI3K) son comunes en tumores, incluyendo cánceres de mama, de colon y endometriales y en glioblastomas. Además, en muchos cánceres, los RTK a menudo están mutados, amplificadas o con expresión aumentada, ocasionando de este modo una activación aberrante de PI3K. En conjunto, estos hallazgos han hecho que los componentes de la ruta PI3K sean dianas atractivas para la terapia contra el cáncer.

El documento WO 2009/108637 describe composiciones y métodos para detectar los estados de activación de los componentes de las rutas de transducción de señales en células tumorales.

El documento WO 2005/037071 se refiere a un método para determinar el estado de activación de las rutas de receptores de tirosina quinasa (RTK) bien en muestras de células o en muestras de pacientes, midiendo la dimerización de los receptores y las cantidades relativas de los complejos de proteína-proteína o proteínas efectoras activadas, que son característicos de una ruta RTK.

Actualmente se están investigando diversos inhibidores de la ruta PI3K en estudios preclínicos y los resultados parecen ser prometedores (Markman *et al.*, Annls. Oncol. 21(4), 683-691 (2010)). En algunos pacientes que recibían inhibidores de PI3K se observó inhibición de la proliferación de las células cancerosas (Courtney *et al.* J. Clin. Oncol. 28(6), 1075-1083 (2010)). Si bien estas terapias con PI3K han tenido éxito en el tratamiento de cánceres (Baselga *et al.*, J. Clin. Oncol., 28: 15s, abstract 3003, (2010); Burris *et al.*, J. Clin. Oncol., 28: 15s, abstract 3005, (2010)), es importante reconocer que no todos los sujetos tratados responden, o responden bien. Se necesitan métodos para predecir qué sujetos responden posiblemente bien al inhibidor diana. Desgraciadamente, la presencia de mutaciones somáticas de PI3K hace que no pueda predecirse adecuadamente la respuesta terapéutica. Por tanto, se necesitan

ensayos con biomarcadores predictivos que investiguen rutas de señalización clave que puedan usarse para determinar la sensibilidad clínica a inhibidores de PI3K y una terapia de combinación con inhibidores de PI3K.

Breve resumen de la invención

La ruta PI3K se ha implicado en numerosos cánceres, tales como cáncer de mama, de pulmón, gástrico, colorrectal y pancreático y es una diana terapéutica útil para cánceres, incluso para los que ya no responden a la terapia existente contra el cáncer. Los inhibidores de PI3K están en desarrollo y han demostrado ser prometedores en algunos estudios realizados con pacientes. La presente divulgación proporciona métodos de ensayo para controlar la ruta PI3K en pacientes con cáncer o tumores sólidos.

Como tal, la presente divulgación proporciona métodos para detectar y cuantificar componentes activados de la ruta PI3K y/o proteínas de rutas de señalización asociadas o adyacentes. Los métodos son también útiles para evaluar la adaptación del tumor, tal como la activación y/o expresión de derivación contra rutas asociadas o adyacentes no directamente dirigidas por una terapia existente. Los métodos se usan para predecir un beneficio clínico del paciente de un inhibidor de PI3K o de una terapia de combinación con inhibidores de PI3K. La información obtenida por la práctica de la presente invención puede usarse para el diagnóstico y el pronóstico de un cáncer y para diseñar tratamientos o regímenes contra el cáncer.

La invención se refiere a un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene, o se sospecha que tiene, cáncer, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK), en el que la medición comprende:

(i) incubar un extracto celular con una, o una pluralidad, de series de dilución de anticuerpos de captura, para formar una pluralidad de analitos capturados, en el que el extracto celular se aísla de un sujeto que tiene cáncer después de la administración de un fármaco contra el cáncer o en el que el extracto celular se pone en contacto con un fármaco contra el cáncer;

(ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden un primer anticuerpo, o una pluralidad de primeros anticuerpos, independientes de un estado de activación y un segundo anticuerpo, o una pluralidad de segundos anticuerpos, independientes de un estado de activación, específicos de un primer y segundo elemento, respectivamente, de un par dimerizado de analitos para formar una pluralidad de analitos dimerizados capturados detectables, en el que los primeros anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con un primer elemento de un par de amplificación de señal y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se dirige hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal;

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

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

(b) seleccionar un fármaco contra el cáncer comparando la dimerización de al menos dos RTK con un perfil de dimerización de referencia de las dos mismas RTK, en el que el perfil de dimerización de referencia se genera en ausencia del fármaco contra el cáncer.

Adicionalmente, el método de la invención puede comprender calibrar el nivel de dimerización de al menos dos RTK con respecto a una curva patrón generada para dichas al menos dos RTK.

El fármaco contra el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en un compuesto modulador de PI3K, un compuesto modulador de RTK, o una combinación de los mismos.

Las al menos dos RTK pueden ser un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dímero HER1/HER2, un dímero HER1/HER3, un dímero HER2/HER3, un dímero HER2/HER2, un dímero HER2/HER4, un dímero p95HER2/HER3 y un dímero p95HER2/HER2.

El extracto celular puede aislarse de un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, cáncer, seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de pulmón, pancreático, colorrectal o gástrico.

Los primeros anticuerpos independientes de un estado de activación, pueden marcarse directamente con un grupo funcional facilitador, y los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación pueden marcarse directamente con el primer elemento del par de amplificación de señal.

Los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación pueden marcarse con el primer elemento del par de amplificación de señal mediante la unión entre un primer elemento de un par de unión conjugado con los anticuerpos independientes de un estado de activación y un segundo elemento del par de unión conjugado con el primer elemento del par de amplificación de señal; y el primer elemento del par de unión puede ser biotina y/o el segundo elemento del par de unión puede ser estreptavidina.

El grupo funcional facilitador puede ser una glucosa oxidasa.

El primer elemento del par de amplificación de señal puede ser una peroxidasa.

Una realización adicional de la invención se refiere a un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, cáncer, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de activación de un complejo de PI3K, en el que dicho complejo de PI3K comprende i) la dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK); y ii) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K, comprendiendo dicha medición:

(i) incubar un extracto celular con una o con una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados, en el que el extracto celular se aísla de un sujeto que tiene cáncer después de la administración de un fármaco contra el cáncer o en el que el extracto celular se pone en contacto con un fármaco contra el cáncer;

(iia) incubar la pluralidad de analitos capturados con primeros anticuerpos de detección que comprenden bien a) un primer anticuerpo, o una pluralidad de primeros anticuerpos, independientes de un estado de activación, específicos de un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado o b) una subunidad p110 de PI3K; y segundos anticuerpos de detección que comprenden bien a) un segundo anticuerpo, o una pluralidad de segundos anticuerpos, independientes de un estado de activación, específicos del otro elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado, una subunidad p85 de PI3K o una subunidad p110 de PI3K o b) anticuerpos dependientes de un estado de activación específicos de una subunidad p85 de PI3K y/o de una subunidad p110 de PI3K para formar una pluralidad de analitos dimerizados para formar una pluralidad de analitos dimerizados y formando complejo, capturados detectables, o

(iib) incubar la pluralidad de analitos capturados con primeros anticuerpos de detección que comprenden un primer o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de un estado de activación, específicos de una subunidad p110 de PI3K; y de segundos anticuerpos de detección que comprenden bien a) un segundo anticuerpo, o una pluralidad de segundos anticuerpos, independientes de un estado de activación, específicos de un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado, o una subunidad p85 de PI3K o b) anticuerpos dependientes de un estado de activación específicos de una subunidad p85 de PI3K para formar una pluralidad de analitos dimerizados y formando complejo, capturados detectables, en el que los primeros anticuerpos de detección se marcan con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos de detección se marcan con un primer elemento de un par de amplificación de señal, y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se dirige hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal;

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

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

(b) seleccionar un fármaco contra el cáncer comparando el nivel de activación del complejo PI3K con un perfil de activación del complejo PI3K de referencia en el que el perfil de dimerización de referencia se genera en ausencia del fármaco contra el cáncer.

El método puede comprender adicionalmente calibrar el nivel del complejo PI3K con respecto a una curva patrón generada por dicho complejo PI3K que comprende i) la dimerización de al menos dos receptores de tirosina quinasa (RTK); ii) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K.

Las al menos dos RTK, pueden ser un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dímero HER1/HER2, un dímero HER1/HER3, un dímero HER2/HER3, un dímero HER2/HER2, un dímero HER2/HER4, un dímero p95HER2/HER3 y un dímero p95HER2/HER2.

El extracto celular puede aislarse de un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de pulmón, pancreático, colorrectal o gástrico.

Los primeros anticuerpos de detección pueden marcarse directamente con el grupo funcional facilitador.

Los segundos anticuerpos de detección pueden marcarse directamente con el primer elemento del par de amplificación de señal.

5 Los segundos anticuerpos de detección pueden marcarse con el primer elemento del par de amplificación de señal mediante la unión entre un primer elemento de un par de unión conjugado con los segundos anticuerpos de detección y un segundo elemento del par de unión conjugado con el primer elemento del par de amplificación de señal.

10 El primer elemento del par de unión puede ser biotina y/o el segundo elemento del par de unión puede ser estreptavidina.

El grupo funcional facilitador puede ser la glucosa oxidasa.

15 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán obvios para un experto en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y de las figuras.

Breve descripción de las figuras

20 La FIG. 1A-C muestra un ensayo para la detección de la dimerización de los receptores tirosina quinasa.

La FIG. 2 muestra un complejo PI3K, 210, detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento.

25 La FIG. 3 muestra un complejo PI3K, 310, detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento.

30 La FIG. 4A muestra un complejo PI3K detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. La FIG. 4B muestra un complejo PI3K detectable mediante los métodos de ensayo descritos en el presente documento. La FIG. 4C ilustra la detección de complejos PI3K usando un método. Los complejos PI3K se detectaron en células T47D (línea celular tumoral epitelial de mama ductal humano) tratadas con herregulina (HRG), en comparación con células no tratadas.

35 La FIG. 5A muestra un complejo PI3K detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. La FIG. 5B muestra un complejo PI3K detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento.

40 La FIG. 6 ilustra una comparación de fosfo-AKT y fosfo-PI3K en un análisis de perfilado de ruta de un paciente con cáncer de mama.

La FIG. 7 ilustra que la presencia de fosfo-PI3K se correlaciona con la de fosfo-AKT en 60 muestras obtenidas con AAF (aspiración con aguja fina) de pacientes con cáncer de mama. La AKT activada se detectó en pacientes sin mutaciones en PI3KCA.

45 La FIG. 8 ilustra la correlación entre AKT y PI3K. El gráfico muestra que la AKT activada (pAKT) no se correlaciona con la presencia de mutaciones somáticas en PI3KCA.

50 La FIG. 9 ilustra un alto grado de correlación entre la presencia de fosfo-HER3 y fosfo-PI3K en 60 muestras obtenidas con AAF de pacientes con cáncer de mama. Independientemente del valor límite para PI3K usado en el ensayo, en las muestras hay una correlación entre fosfo-HER3 y fosfo-PI3K.

La FIG. 10 ilustra una correlación entre la presencia de fosfo-HER3 y fosfo-AKT en pacientes con cáncer de mama.

55 La FIG. 11 muestra que la PI3K activada está asociada con la AKT y fosfo-HER3 activadas. La FIG. 11 también muestra que la AKT activada se correlaciona con la fosfo-HER3 en ausencia de activación de PI3K.

60 La FIG. 12 muestra que la fosfo-HER2 está asociada con PI3K activada y AKT activada en muestras AAF de pacientes con cáncer de mama.

La FIG. 13 muestra la activación simultánea de fosfo-HER2, fosfo-PI3K y fosfo-AKT en muestras de pacientes con cáncer de mama que no tienen mutaciones o amplificaciones genéticas en HER2.

65 La FIG. 14 muestra las proteínas HER1, HER2, HER3, p95, ERK, Shc, PI3K, AKT y ERK activadas en una muestra de un paciente con cáncer de mama que recayó con terapia de combinación de Herceptina.

La FIG. 15 muestra las proteínas HER2, HER3, cMet, ERK, PI3K, y AKT activadas en una muestra de un paciente con cáncer de mama, con una mutación somática del gen PI3KCA, H1047R, que recayó con terapia de combinación de Herceptina.

La FIG. 16 muestra un análisis CEER-AAF de la activación de la ruta PI3K en muestras de células tumorales NSCLC (cáncer pulmonar no microcítico, del inglés: *Non Small-Cells Lung Cancer*) después de tratamiento con un inhibidor de AKT, un inhibidor de HER1 o terapia de combinación.

La FIG. 17 ilustra un análisis CEER-AAF de biomarcadores en el perfilado de rutas de muestras de células de cáncer de mama después de tratamiento con un inhibidor de AKT, Lapatinib (un inhibidor de tirosina quinasa) o terapia de combinación.

La FIG. 18 muestra datos sin procesar de heterocomplejos HER1/2 y HER2/3 en células MCF7 detectados usando un ensayo nuevo de dímeros basado en proximidad.

La FIG. 19 muestra la activación de complejos de heterodímeros de HER3 y de complejos de HER3/PI3K en una muestra de tumor pancreático y en células HDPE. El ensayo de dímeros CEER se realizó a 10 µg, 5 µg y 2 µg usando una combinación de anticuerpos de captura y de detección múltiple. Se muestran datos de 5 µg para todos los complejos, excepto para el complejo HER3/PI3K a 10 µg. Las células HPDE y la muestra tumoral 10-494 forma complejos 1:2 y 2:3, respectivamente. En lo que respecta a las células HPDE, la muestra tumoral tiene niveles más altos de fosfo-HER3 y están asociados con PI3K para formar un complejo HER3/PI3K.

La FIG. 20 muestra la activación de heterodímeros de HER2 y PI3K en respuesta a HRG o EGF en células MCF7 (una línea celular de adenocarcinoma de mama humano).

La FIG. 21 ilustra datos sin procesar del análisis de la ruta CEER-AAF de pacientes con cáncer de mama.

La FIG. 22 ilustra análisis de la ruta CEER-AAF de más pacientes con cáncer de mama.

La FIG. 23 ilustra análisis de la ruta de CEER-AAF de aún más pacientes con cáncer de mama.

La FIG. 24 ilustra análisis de la ruta CEER-AAF de pacientes con cáncer de mama.

La FIG. 25 ilustra la activación de IGF-1R, PI3K, AKT y ERK en un paciente con cáncer de mama.

La FIG. 26 ilustra la activación de IGF-1R y AKT en un paciente con cáncer de mama. Los niveles de IGF-1R activado se correlacionan con los niveles de fosfo-AKT. Además, los niveles elevados de IGF-1R total también se correlacionan con fosfo-AKT.

La FIG. 27 ilustra la activación de PI3K junto con la activación de IGF-1R o cMET en pacientes con NSCLC. La muestra tumoral del paciente 1 con la mutación del gen KRAS, G12C, tuvo niveles altos de IGF-1R total y fosforilado junto con altos niveles de PI3K formando complejo y fosfo-PI3K. El análisis del perfilado de la ruta también mostró que la muestra tumoral del paciente 2 también expresaba altos niveles de IGF-1R total y fosforilado, de complejo PI3K y de fosfo-PI3K.

La FIG. 28 ilustra que en un paciente con cáncer de pulmón se detecta activación de PI3K, junto con activación de HER3 y/o cMET.

La FIG. 29 ilustra la activación simultánea de HER3, cMET y PI3K en un paciente con NSCLC con una mutación del gen KRAS, G12C. También se detectan otras proteínas efectoras aguas abajo activadas (por ejemplo FAK y CRKL). La expresión de VEGFR2 fue alta y tanto FGFR1 como FGFR2 estaban activadas en la muestra. El perfilado del análisis de la ruta se realizó en la muestra tumoral antes del tratamiento.

La FIG. 30 muestra un "mapa de calor" de la activación de PI3K y de heterodímeros de HER en pacientes con NSCLC. En las muestras tumorales se detectó la dimerización de ErbB y la activación de la ruta PI3K.

La FIG. 31 ilustra la activación simultánea de HER3 y PI3K en una muestra tumoral, sin mutaciones somáticas del gen KRAS y EGFR, de un paciente con NSCLC. También se detectaron niveles de CRKL, FAK y She activados. La expresión de VEGFR2 total también fue alta.

La FIG. 32 ilustra la presencia de fosfo-HER3 en muestras de pacientes con cáncer gástrico. En algunas muestras, HER3 activado se correlaciona con la presencia de cMET activado. En diversas muestras de tumor gástrico se detectaron receptores ErbB activados.

La FIG. 33 muestra un gráfico de escalado multidimensional (EMD) que presenta la concordancia de marcadores de ruta fosforilada.

La FIG. 34 ilustra una comparación de fosfo-PI3K y fosfo-AKT1/ERK en el análisis de perfilado de ruta de pacientes con cáncer gástrico. En algunas muestras se detectó activación de la familia FGFR, que incluye FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4.

La FIG. 35 ilustra la activación de la ruta PI3K y la activación de la ruta HER en un paciente con cáncer colorrectal antes de la terapia.

La FIG. 36 ilustra la activación de la ruta PI3K y la activación de la ruta HER en una muestra con una mutación del gen KRAS, G13D, tomada de un paciente con cáncer colorrectal antes de la terapia. La FIG. 36 muestra que las proteínas HER1 (EGFR), HER2, Shc, ERK y AKT están muy activadas.

La FIG. 37 ilustra la activación de la ruta PI3K y la activación de la ruta HER en un paciente con cáncer colorrectal con una mutación del gen KRAS, G12D, antes del tratamiento.

La FIG. 38 ilustra análisis AAF de biomarcadores en un perfilado de ruta de muestras de pacientes con cáncer colorrectal.

La FIG. 39 ilustra análisis AAF de biomarcadores en un perfilado de ruta de muestras de pacientes con cáncer pancreático con mutaciones del gen KRAS.

La FIG. 40 ilustra análisis AAF de biomarcadores en un perfilado de ruta de muestras de pacientes con cáncer pancreático con y sin mutaciones del gen KRAS.

La FIG. 41 muestra un esquema de un método ejemplar de un perfilado de enfermedad exhaustivo usando una combinación de análisis de ácido nucleico y proteína funcional.

La FIG. 42 muestra los detalles del estudio clínico descrito en el Ejemplo 12.

La FIG. 43 muestra más detalles del estudio clínico descrito en el Ejemplo 12.

La FIG. 44 ilustra el perfilado de la ruta PI3K activada (fosforilada) de aspirado de muestras de cáncer de mama (por ejemplo, A, B, C y D) expuesto a inhibidor de HER1.

La FIG. 45 ilustra el perfilado de la ruta PI3K activada (fosforilada) de AAF de un tumor de mama y de AAF de un tumor de nódulo linfático.

La FIG. 46A ilustra el nivel de la expresión de componentes proteicos de la ruta PI3K determinado mediante el ensayo CEER. La FIG. 46B muestra que los niveles proteicos de HER1, HER2, HER3, cMET, IGF1R y CK son similares en el tumor de mama y tumor de nódulo linfático de los pacientes.

La FIG. 47 muestra que en una cohorte de pacientes con cáncer de mama hay correlaciones estadísticamente significativas entre las proteínas de la ruta PI3K activada, las mutaciones en el gen PI3K activadas y sus combinaciones. Hay una correlación entre el nivel de fosfo-HER2 en pacientes con una puntuación de IHC HER2 primaria de +1 y +2 y el nivel de fosfo-AKT medido por CEER. En el 37 % de los pacientes en los que se realiza el perfilado, la presencia de fosfo-HER se correlaciona con la de fosfo-AKT.

La FIG. 48 ilustra los datos obtenidos de un perfilado de enfermedad exhaustivo del Paciente 14003-3004 del estudio. El paciente sobreexpresa HER2 y tiene un tumor con alta actividad de HER3 y PI3K. El perfilado de la enfermedad indica que el paciente puede beneficiarse del inhibidor de PI3K solo o con terapia de combinación.

La FIG. 49 ilustra un perfilado de cáncer de mama comparativo de AAF de un tejido adyacente normal y tumoral. La FIG. 49A muestra una imagen inmunohistoquímica de un corte de tejido teñido con un anticuerpo anti-pan CK. Las células tumorales expresan altamente CK en comparación con las células del estroma. La FIG. 49B ilustra los perfiles de la ruta PI3K de muestras de tumor de cáncer de mama y muestras de tejido adyacente normal. La FIG. 49C muestra una representación gráfica de resultados de ensayos CEER-AAF descritos en el presente documento.

La FIG. 50 muestra que el perfilado de ruta de la ruta HER2 proporciona datos más detallados con respecto a p95HER2 y a la expresión de p95HER2 activada en comparación con IHC para HER2 y p95HER2. La FIG. 50A muestra una transferencia de Western para la proteína HER2 y para la proteína p95HER2 en muestras de aspirado de cáncer de mama. La FIG. 50B muestra que las muestras de tumor que expresan altos niveles de HER2 (por ejemplo 3+), medidos por IHC, probablemente sobreexpresan proteína p95HER2 total y proteína p95HER2 activada (fosforilada) en comparación con las que expresan HER2 a niveles de 2+ o 1+/0. La FIG.

50C representa un gráfico de expresión de proteína p95HER2 total agrupada por expresión de HER2 medida por IHC.

La FIG. 51 muestra que 6 muestras AAF que dieron resultado positivo para HER2 mediante CEER eran de pacientes que expresaban células positivas A HER2, determinado mediante IHC primaria.

La FIG. 52 ilustra un ejemplo no limitante de un análisis de ruta exhaustivo usando una combinación de perfilado y genotipado de ruta funcional. En particular, se analizaron muestras de AAF para detectar componentes totales y activados (es decir fosforilados) de la ruta de señalización (por ejemplo HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, CK, PI3K, SHC, AKT y/o ERK) mediante ensayo CEER y para detectar mutaciones somáticas en genes tales como PIK3CA, KRAS y/o BRAF.

Descripción detallada

I. Introducción

Se sabe que la ruta de transducción de señal PI3K actúa como mediadora en funciones normales, fisiológicas, del metabolismo y supervivencia celular, sin embargo, la activación aberrante de la ruta puede conducir a tumorigénesis o a metástasis tumoral. La señalización a través de la ruta PI3K está regulada positivamente en muchas células cancerosas, especialmente después de quimioterapia. Además, la activación de PI3K predice resistencia terapéutica a una amplia serie de terapias contra el cáncer. También se ha observado que otras rutas oncogénicas clave convergen e interaccionan con la ruta PI3K.

Una estrategia en el desarrollo de la terapia tumoral es bloquear la señalización intracelular a través de estas rutas. Los modelos preclínicos han demostrado que el uso de inhibidores de la ruta PI3K puede suscitar respuestas drásticas contra el cáncer en pacientes con cáncer de mama con activación de PI3K. Lo que es más interesante, la presencia de mutaciones de PI3KCA no se correlaciona con las de los pacientes que responden a terapia con PI3K. Los métodos de la invención se usan para medir (por ejemplo, detectar y cuantificar) la activación de la ruta PI3K así como otras rutas de señalización que convergen con la señalización de PI3K. Estos métodos son útiles en la selección de pacientes con cáncer que serán clínicamente sensibles a inhibidores de PI3K y a una terapia de combinación con inhibidor de PI3K. El control continuado de las rutas de transducción de señal que están activas en las células cancerosas como progresos de tratamiento puede ofrecer al médico información adicional sobre la eficacia del tratamiento, alentando al médico a continuar con un ciclo de tratamiento particular o a cambiar a otra línea de tratamiento, cuando, por ejemplo, las células cancerosas se hacen resistentes al tratamiento a través de aberraciones adicionales que activan bien la misma u otra ruta de transducción de señal.

Los métodos del presente documento se han utilizado para determinar qué células tumorales pueden activar una o más rutas de señalización compensatorias en respuesta a una terapia contra el cáncer. Sin ligarse a ninguna teoría particular, se piensa que las células tumorales se adaptan a inhibidores de ruta específicos activando rutas de señalización asociadas que no son dianas dirigidas del inhibidor. Por tanto, la terapia de combinación con un inhibidor de PI3K puede precisar conseguir una respuesta óptima al tratamiento en algunos cánceres. Además, estos hallazgos ponen en relieve la necesidad de métodos para controlar, en un entorno clínico, rutas de señalización activadas.

II. Definiciones

De la manera en la que se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a los mismos salvo que se especifique otra cosa.

El término "cáncer" incluye cualquier elemento de una clase de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento incontrolado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas que se conocen, caracterizados tanto como malignos, benignos, de tejido blando o sólido y cánceres de todos los estadios y grados incluyendo cánceres pre- y postmetastásicos. Los ejemplos de los diferentes tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama; cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico), cánceres digestivo y gastrointestinal, tal como cáncer colorrectal, tumores estromales gastrointestinales, tumores carcinoideos gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer de conducto biliar, cáncer de intestino delgado, y cáncer de estómago (gástrico), cáncer esofágico, cáncer de vesícula biliar; cáncer de hígado; cáncer pancreático; cáncer de apéndice; cáncer de ovario; cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales); cáncer del sistema nervioso central; cáncer de piel; linfomas; coriocarcinomas; cánceres de cabeza y cuello; sarcomas osteogénicos; y cánceres hematológicos. De la manera en la que se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas. El tumor de mama puede proceder de un sujeto con una forma invasiva o *in situ* de carcinoma ductal o carcinoma lobular. Como alternativa, el cáncer tumoral puede proceder de un sujeto con cáncer de mama recurrente o metastásico.

El término "analito" incluye cualquier molécula de interés, generalmente una macromolécula, tal como un polipéptido, cuya presencia, cantidad (nivel de expresión), estado de activación y/o identidad se determina. En algunos casos, el

analito es una molécula de transducción de señal tal como, por ejemplo, un componente de una ruta de señalización de HER2 (ErbB2).

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

La expresión “alteración de la ruta PI3K” se refiere a alteración aberrante de la regulación de la ruta de señalización de PI3K debido a mutaciones en el gen PI3K, a amplificaciones en el gen PI3K y/o a la pérdida de PTEN.

Las expresiones “receptor de tipo tirosina quinasa” o “RTK” incluyen cualquier elemento de una familia de receptores cada uno de ellos caracterizado por tener una parte extracelular, una transmembrana y una parte intracelular, mientras que las tirosina quinasas de tipo no receptor son completamente intracelulares. La familia de receptores comprende una gran cantidad de receptores transmembrana con diversas actividades biológicas. De hecho, se han identificado aproximadamente 20 subunidades diferentes de tirosina quinasas de tipo receptor. Una subfamilia de tirosina quinasas, denominada subfamilia HER (ErbB), está constituida por EGFR (HER1), HER2, HER3, y HER4. Los ligandos de esta subfamilia de receptores identificados hasta ahora incluyen el factor de crecimiento epitelial, TGF-alfa, anfirregulina, HB-EGF, betacelulina y herregulina. Otra subfamilia de estas tirosina quinasas de tipo receptor es la subfamilia de la insulina, que incluye INS-R, IGF-IR y IR-R. La subfamilia PDGF incluye los receptores alfa y beta de PDGF, CSFIR, c-kit y FLK-II.

La expresión “componente de una ruta de señalización de HER2” incluye uno cualquiera o más de un ligando aguas arriba de HER2, un compañero de unión de HER2 y/o una molécula efectora aguas abajo que se modula a través de HER2. Los ejemplos de componentes de la ruta de señalización de HER2 incluyen, pero sin limitación, herregulina, HER1/ErbB1, HER2/ ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4, AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, PTEN, SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, la alfa I variante de corte y empalme), proteínas tirosina fosfatasa (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP 1, etc.), dímeros de HER2 (por ejemplo, p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3; HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, etc.), GSK-3 β , PIP2, PIP3, p27 y sus combinaciones.

La expresión “componente de una ruta de señalización de HER3” incluye uno cualquiera o más de un ligando aguas arriba de HER3, un compañero de unión de HER3 y/o una molécula efectora aguas abajo que se modula a través de HER3. Los ejemplos de componentes de la ruta de señalización de HER3 incluyen, pero sin limitación, herregulina, HER1/ErbB1, HER2/ ErbB2, HER3/ErbB3, HER4/ErbB4, AKT (por ejemplo, AKT1, AKT2, AKT3), MEK (MAP2K1), ERK2 (MAPK1), ERK1 (MAPK3), PI3K (por ejemplo, PIK3CA (p110), PIK3R1 (p85)), PDK1, PDK2, PTEN, SGK3, 4E-BP1, P70S6K (por ejemplo, la variante alfa I de corte y empalme), proteínas tirosina fosfatasa (por ejemplo, PTP1B, PTPN13, BDP1, etc.), dímeros de HER2 (por ejemplo, p95HER2/HER3, p95HER2/HER2, HER2/HER2, HER2/HER3, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, etc.), GSK-3 β , PIP2, PIP3, p27, y sus combinaciones.

La expresión “adaptación de tumor” incluye un proceso en el que las células de un tumor se exponen a terapia contra el cáncer y activan rutas de señalización asociadas con, o adyacentes a, la ruta de señalización a la que dirige directamente el agente terapéutico. Las células tumorales activan rutas de señalización asociadas/adyacentes como un mecanismo para compensar el bloqueo o la inhibición como consecuencia de la terapia dirigida.

La expresión “estado de activación” incluye una molécula de transducción de señal particular tal como un componente de la ruta de señalización de HER2 en su forma activada. De manera similar, la expresión “nivel de activación” se refiere al grado al cual está activada una molécula de transducción de señal particular, tal como un componente de la ruta de señalización de HER2. Generalmente, el estado de activación corresponde al estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejos, de una o más moléculas de transducción de señales. Los ejemplos no limitantes de estados de activación (indicados entre paréntesis) incluyen: EGFR (EGFRvIII, (p-) EGFR fosforilado, EGFR:Shc, (u-) EGFR ubiquitinado, p-EGFRvIII); ErbB2 (p-ErbB2, p95HER2 (ErbB2 truncada), p-p95HER2, ErbB2:Shc, ErbB2:PI3K, ErbB2:EGFR, ErbB2:ErbB3, ErbB2:ErbB4); ErbB3 (p-ErbB3, ErbB3:PI3K, p-ErbB3:PI3K, ErbB3:Shc); ErbB4 (p-ErbB4, ErbB4:Shc); c-MET (p-c-MET); AKT1 (p-AKT1); AKT2 (p-AKT2); AKT3 (p-AKT3); PTEN (p-PTEN); P70S6K (p-P70S6K); MEK (p-MEK); ERK1 (p-ERK1); ERK2 (p-ERK2); PDK1 (p-PDK1); PDK2 (p-PDK2); SGK3 (p-SGK3); 4E-BP1 (p-4E-BP1); PIK3R1 (p-PIK3R1); c-KIT (p-c-KIT); ER (p-ER); IGF-1R (p-IGF-1R, IGF-1R:IRS, IRS:PI3K, p-IRS, IGF-1R:PI3K); INSR (p-INSR); FLT3 (p-FLT3); HGFR1 (p-HGFR1); HGFR2 (p-HGFR2); RET (p-RET); PDGFRA (p-PDGFRA); PDGFRB (p-PDGFRB); VEGFR1 (p-VEGFR1, VEGFR1:PLC γ , VEGFR1:Src); VEGFR2 (p-VEGFR2, VEGFR2:PLC γ , VEGFR2:Src, VEGFR2:heparin sulfato, VEGFR2:VE-cadherina); VEGFR3 (p-VEGFR3); FGFR1 (p-FGFR1); FGFR2 (p-FGFR2); FGFR3 (p-FGFR3); FGFR4 (p-FGFR4); TIE1 (p-TIE1); TIE2 (p-TIE2); EPHA (p-EPHA); EPHB (p-EPHB); GSK-3 β (p-GSK-3 β); NFkB (p-NFkB), IKB (p-IBK, p-P65:IKB); BAD (p-BAD, BAD:14-3-3); mTOR (p-mTOR); Rsk-1 (p-Rsk-1); Jnk (p-Jnk); P38 (p-P38); STAT3 (p-STAT3); Fak (p-Fak); Rb (p-Rb); Ki67; p53 (p-p53); CREB (p-CREB); c-Jun (p-c-Jun); c-Src (p-c-Src); y paxilina (p-paxilina).

De la manera en la que se usa en el presente documento, la expresión “serie de dilución” pretende incluir una serie de concentraciones descendientes de una muestra particular (por ejemplo, un lisado celular) o reactivo (por ejemplo, un anticuerpo). Una serie de dilución se produce generalmente mediante un proceso de mezcla de una cantidad medida de una concentración de partida de una muestra o reactivo, con un diluyente (por ejemplo, un tampón de dilución) para crear una concentración más baja de la muestra o reactivo, y repetir el proceso un número de veces suficiente hasta obtener el número de diluciones en serie deseado. La muestra o el reactivo puede diluirse en serie al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 500, o 1000 veces para producir una serie de dilución que comprenda al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 concentraciones descendientes de la muestra o reactivo. Por ejemplo, una serie de dilución que comprenda una dilución en serie de factor 2 de un reactivo de anticuerpo de captura a una concentración de partida de 1 mg/ml puede producirse mezclando una cantidad de la concentración de partida del anticuerpo de captura con una misma cantidad de un tampón de dilución para crear una concentración de 0,5 mg/ml del anticuerpo de captura, y repetir el proceso para obtener concentraciones del anticuerpo de captura de 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,0325 mg/ml, etc.

La expresión “intervalo dinámico superior”, de la manera en la que se usa en el presente documento, incluye la capacidad de un ensayo para detectar un analito específico en tan solo una célula o hasta en miles de células. Por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento poseen un rango dinámico superior porque de manera ventajosa detectan una molécula de transducción de señal particular de interés en aproximadamente 1-10.000 células (por ejemplo, en aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, o 10.000 células) utilizando una serie de dilución de concentraciones del anticuerpo de captura.

De la manera en la que se usa en el presente documento, la expresión “células circulantes” comprende células extratumorales que se han metastatizado o micrometastatizado de un tumor sólido. Como ejemplos de células circulantes se incluyen, si limitación, células tumorales circulantes, células madre cancerosas y/o células que migran al tumor (por ejemplo, células progenitoras endoteliales circulantes, células endoteliales circulantes, células mieloides proangiogénicas circulantes, células dendríticas circulantes, etc.). Pueden obtenerse muestras de pacientes que contengan células circulantes de cualquier fluido biológico accesible (por ejemplo, sangre entera, suero, plasma, esputo, fluido de lavado bronquial, orina, aspirado de pezón, linfa, saliva, aspirado con aguja fina, etc.). En determinados casos, la muestra de sangre entera está separada en una fracción de plasma o suero y una fracción celular (por ejemplo, un sedimento celular). La fracción celular generalmente contiene eritrocitos, leucocitos y/o células circulantes de tumor sólido tales como células tumorales circulantes (CTC), células endoteliales circulantes (CEC), células progenitoras endoteliales circulantes (CPEC), células madre cancerosas (CMC), células tumorales diseminadas de nódulo linfático y combinaciones de los mismos. La fracción de plasma o suero normalmente contiene, entre otras cosas, ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN) y proteínas que liberan las células circulantes de un tumor sólido.

Las células circulantes se aíslan generalmente de una muestra de un paciente utilizando uno o más métodos de separación entre los que se incluyen, por ejemplo, separación inmunomagnética (véase, por ejemplo, Racila *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 4589-4594 (1998); Bilkenroth *et al.*, Int. J. Cancer, 92: 577-582 (2001)), the CellTracks[®] System by Immunicon (Huntingdon Valley, PA), separación de microfluidos (véase, por ejemplo, Mohamed *et al.*, IEEE Trans. Nanobiosci., 3: 251-256 (2004); Lin *et al.*, Abstract No. 5147, 97th AACR Annual Meeting, Washington, D. C. (2006)), FACS (véase, por ejemplo, Mancuso *et al.*, Blood, 97: 3658-3661 (2001)), centrifugación en gradiente de densidad (véase, por ejemplo, Baker *et al.*, Clin. Cancer Res., 13: 4865-4871 (2003)), y métodos de empobrecimiento (véase, por ejemplo, Meyre *et al.*, Int. J. Oncol, 21: 521-530 (2002)).

El término “muestra”, de la manera en la que se usa en el presente documento, incluye cualquier espécimen biológico obtenido de un paciente. Las muestras incluyen, sin limitación, sangre entera, plasma, suero, eritrocitos, leucocitos (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica), fluido de lavado ductal, aspirado de pezón, linfa (por ejemplo, células tumorales diseminadas de nódulo linfático), aspirado de médula ósea, saliva, orina, materia fecal (es decir, heces), esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado con aguja fina (por ejemplo recogido mediante aspiración periareolar al azar con aguja fina), cualquier otro fluido corporal, una muestra de tejido (por ejemplo, tejido tumoral) tal como una biopsia de un tumor (por ejemplo, biopsia con aguja) o un nódulo linfático (por ejemplo, biopsia de nódulo linfático centinela) y sus extractos celulares. En algunos casos la muestra es sangre entera o un componente de una fracción de la misma tal como plasma, suero o un sedimento celular. La muestra puede obtenerse aislando células circulantes de un tumor sólido, de sangre entera o de una fracción celular de la misma, usando cualquier técnica conocida en la materia. Como alternativa, la muestra puede ser una muestra de tejido de tumor embebida en parafina fijada en formalina (FFPE, *formalin fixed paraffin embedded*), por ejemplo, de un tumor sólido de la mama.

Una “biopsia” se refiere al proceso de extraer una muestra de tejido para evaluar un diagnóstico o pronóstico, y el propio espécimen de tejido. Para los métodos y composiciones puede aplicarse cualquier técnica de biopsia conocida en la materia. La técnica de biopsia aplicada generalmente dependerá, entre otros factores, del tipo de tejido y del tamaño y tipo de tumor (es decir, sólido o suspendido (es decir sangre o líquido ascítico)) que vaya a evaluarse. Las técnicas representativas de biopsia incluyen biopsia excisional, biopsia incisional, biopsia con aguja (por ejemplo, biopsia con aguja gruesa, biopsia de aspiración con aguja fina, etc.), biopsia quirúrgica y biopsia de médula ósea. Se comentan técnicas de biopsia, por ejemplo, en Harrison’s Principles of Internal Medicine, Kasper, *et al.*, eds., 16ª ed., 2005, capítulo 70, y en toda la Parte V. Un experto en la materia apreciará que pueden realizarse técnicas de biopsia para identificar células cancerosas y/o precancerosas en una muestra de tejido determinada.

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

Una “matriz” o “micromatriz” comprende un conjunto y/o series de dilución distintos de anticuerpos de captura inmovilizados o retenidos en un soporte sólido, tal como, por ejemplo, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, pines, filtros, perlas (por ejemplo, perlas magnéticas, perlas de poliestireno, etc.), papel, membranas (por ejemplo, de nylon, nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno (PVDF), haces de fibras o cualquier otro sustrato adecuado. Los anticuerpos de captura generalmente se inmovilizan o se retienen en el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). En algunos casos, los anticuerpos de captura comprenden etiquetas de captura que interaccionan con agentes de captura unidos al soporte sólido. Las matrices usadas en los ensayos descritos en el presente documento comprenden generalmente una pluralidad de anticuerpos de captura y/o concentraciones de anticuerpos de captura diferentes, que se acoplan a la superficie de un soporte sólido en diferentes lugares conocidos/localizables.

La expresión “anticuerpo de captura” pretende incluir un anticuerpo inmovilizado que es específico (es decir, se une, está unido por, o forma un complejo con) de uno o más analitos de interés en una muestra, tal como un extracto celular. El anticuerpo de captura puede retenerse en un soporte sólido en una matriz. En Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO), y BD Biosciences (San José, CA) disponen de anticuerpos de captura adecuados para inmovilizar cualquiera de una diversidad de moléculas de transducción de señal en un soporte sólido.

La expresión “anticuerpo de detección”, de la manera en la que se usa en el presente documento, incluye un anticuerpo que comprende un marcador detectable que es específico (es decir, se une a, está unido por, o forma un complejo con) de uno o más analitos de interés en una muestra. La expresión también incluye un anticuerpo que es específico de uno o más analitos de interés, en el que el anticuerpo puede unirse mediante otra especie que comprenda un marcador detectable. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen, pero sin limitación, marcadores de biotina/estreptavidina, marcadores de ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótidos), marcadores químicamente reactivos, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores radioactivos, y combinaciones de los mismos. En Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma (St. Louis, MO), y BD Biosciences (San José, CA) disponen de anticuerpos de detección adecuados para detectar el estado de activación y/o la cantidad total de cualquiera de una diversidad de moléculas de transducción de señal. Como un ejemplo no limitante, en Santa Cruz Biotechnology, disponen de anticuerpos fosfoespecíficos contra diversas formas fosforiladas de moléculas de transducción de señal, tales como EGFR, c-KIT, c-Src, FLK-1, PDGFRA, PDGFRB, AKT, MAPK, PTEN, Raf, y MEK.

La expresión “anticuerpo dependiente de un estado de activación” incluye un anticuerpo de detección que es específico (es decir, se une a, está unido por, o forma un complejo con) de un estado de activación particular de uno o más analitos de interés en una muestra. Se desvela que, el anticuerpo dependiente de un estado de activación detecta el estado de fosforilación, ubiquitinación y/o formación de complejos, de uno o más analitos, tales como uno

o más moléculas de transducción de señal. Se desvela, usando anticuerpos dependientes de un estado de activación se detecta la fosforilación de elementos de la familia EGFR de receptores tirosina quinasa y/o la formación de complejos heterodiméricos entre elementos de la familia EGFR. Se desvela que los anticuerpos dependientes de un estado de activación son útiles para detectar uno o más sitios de fosforilación en una o más de las siguientes moléculas de transducción de señal (sitios de fosforilación que corresponden a la posición del aminoácido en la secuencia de proteína humana): EGFR/HER1/ErbB1 (por ejemplo, tirosina (Y) 1068); ErbB2/HER2 (por ejemplo, Y1248); ErbB3/HER3 (por ejemplo, Y1289); ErbB4/HER4 (por ejemplo, Y1284); SGK3 (por ejemplo, treonina (T) 256 y/o serina (S) 422); 4E-BP1 (por ejemplo, T70); ERK1 (por ejemplo, T202 y/o Y204); ERK2 (por ejemplo, T202); MEK (por ejemplo, S217 y/o S221); PIK3R1 (por ejemplo, Y688); PDK1 (por ejemplo, S241); P70S6K (por ejemplo, T229, T389, y/o S421); c-MET (por ejemplo, Y1349); PTEN (por ejemplo, S380); AKT1 (por ejemplo, S473 y/o T308); AKT2 (por ejemplo, S474 y/o T309); AKT3 (por ejemplo, S472 y/o T305); GSK-3 β (por ejemplo, S9); NF κ B (por ejemplo, S536); I κ B (por ejemplo, S32); BAD (por ejemplo, S112 y/o S136); mTOR (por ejemplo, S2448); Rsk-1 (por ejemplo, T357 y/o S363); Jnk (por ejemplo, T183 y/o Y185); P38 (por ejemplo, T180 y/o Y182); STAT3 (por ejemplo, Y705 y/o S727); FAK (por ejemplo, Y576); Rb (por ejemplo, S249, T252, y/o S780); p53 (por ejemplo, S392 y/o S20); CREB (por ejemplo, S133); c-Jun (por ejemplo, S63); c-Src (por ejemplo, Y416); y paxilina (por ejemplo, Y118).

La expresión "anticuerpo independiente de un estado de activación" incluye un anticuerpo de detección que es específico de (es decir, se une a, está unido por, o forma un complejo con) uno o más analitos de interés en una muestra sin importar su estado de activación. Por ejemplo, el anticuerpo independiente de un estado de activación puede detectar formas tanto fosforiladas como no fosforiladas de uno o más analitos, tales como una o más moléculas de traducción de señal.

III. Descripción

Se desvelan composiciones y métodos para detectar el estado (por ejemplo, los niveles de expresión y/o de activación) de los componentes de las rutas de transducción de señal en células tumorales procedentes de tejido tumoral o de células circulantes de un tumor sólido con un ensayo de proximidad específico, multicomplejo, de alto rendimiento, como se describe en el presente documento.

Se desvela un método para detectar y/o cuantificar la dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK). Se desvela un método para medir (por ejemplo, detectar y o cuantificar) el nivel del complejo de PI3K que comprende un dímero de RTK, una subunidad reguladora p85 de PI3K, y una subunidad catalítica p110 de PI3K.

La subunidad reguladora p85 de PI3K comprende una cualquiera de las cinco variantes, denominadas p85 α (SEC ID N°: 1), p85 β (SEC ID N°: 2), p55 γ (SEC ID N°: 3), p150 (SEC ID N°: 4), y p101 (SEC ID N°: 5). La subunidad p110 de PI3K comprende una cualquiera de las variantes denominadas p110 α (SEC ID N°: 6), 110 β (SEC ID N°: 7), p110 γ (SEC ID N°: 8), y p110 δ (SEC ID N°: 9).

Se desvela un método para medir (por ejemplo, detectar y cuantificar) el nivel de PI3K activada en células tumorales o en células circulantes de un tumor sólido. Se desvelan métodos para monitorizar la formación de complejos de PI3K, la activación de PI3K (por ejemplo, fosforilación), la activación de proteínas aguas abajo (por ejemplo, proteínas quinasa, adaptadoras, efectoras) de la ruta PI3K y otros transductores de señal de rutas asociadas con la ruta de PI3K.

Se desvelan composiciones y métodos para determinar o predecir la respuesta de un tumor de un paciente a una terapia contra el cáncer (por ejemplo, compuestos que modulan RTK y PI3K, o combinaciones de los mismos). En algunos casos, los métodos se usan para predecir el beneficio clínico de la terapia con un inhibidor de PI3K o con una combinación de inhibidores de PI3K. Por ejemplo, la medición de niveles elevados de activación de PI3K o componentes activados en la ruta de señalización de PI3K en las células tumorales de un paciente utilizando los métodos descritos en el presente documento, predice que el paciente puede beneficiarse clínicamente de la terapia con el inhibidor de PI3K o de la terapia con la combinación de PI3K. Se desvelan composiciones y métodos para seleccionar tratamientos apropiados para regular negativamente o desconectar una o más rutas de transducción de señal mal reguladas. Por tanto, para facilitar el diseño de terapias personalizadas basándose en la firma molecular particular proporcionada por el conjunto de proteínas de transducción de señal total y activada, en un tumor de un paciente determinado, pueden usarse determinados métodos.

Se desvelan métodos de medición (por ejemplo, detección y cuantificación) del nivel de expresión y/o del grado de activación (por ejemplo, fosforilación) de PI3K y de las RTK, de sus sustratos, y/o de otras moléculas de transducción de señal en una muestra tumoral de un paciente reincidente con terapia contra el cáncer. Como tal, la presente divulgación proporciona, de manera ventajosa, beneficios a pacientes con tumores sólidos, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer gástrico, cáncer pancreático y cáncer colorrectal, que reciben una o más terapias dirigidas, explorándolos y monitorizándolos durante el transcurso de la terapia y evaluando si deben cambiarse a una terapia dirigida alternativa o a una terapia de combinación. Se desvelan métodos para determinar si un cáncer o un tumor se han adaptado a una terapia existente contra el cáncer. En determinados casos, la adaptación del tumor a la terapia produce la activación de rutas de señalización

compensatorias que puede detectarse usando los métodos desvelados. En otros casos, la determinación de la adaptación del tumor en un paciente indica que el tratamiento del paciente debe cambiarse a una terapia dirigida alternativa o a una terapia de combinación.

Se desvelan métodos para seleccionar un tratamiento farmacológico contra el cáncer para un paciente con un cáncer de tumor sólido, comparando la detección y/o cuantificación de la dimerización de RTK y/o la formación de complejos de PI3K en las muestras tumorales, bien en presencia o en ausencia de un fármaco contra el cáncer. Ventajosamente las composiciones y los métodos pueden identificar pacientes que son resistentes a terapias contra el cáncer debido a mutaciones en la proteína quinasa diana, a resistencia adquirida a un agente terapéutico, a adaptación a la terapia mediante moléculas de transducción de señal, al no cumplimiento con el régimen terapéutico y/o a la administración de una dosis de fármaco subóptima.

En determinados aspectos, los métodos descritos en el presente documento controlan y siguen la adaptación del cáncer o del tumor a una terapia existente contra el cáncer. En determinados casos, el seguimiento y el control de activación de perfiles de rutas usando técnicas CEER, pueden determinar si hay una compensación de la ruta para la terapia existente, por ejemplo, mediante derivación de la activación y/o expresión a una ruta asociada. Estas técnicas permiten evaluar la eficacia de la terapia. Si la activación de la ruta original está desconectada o disminuida, es importante indagar acerca de las rutas asociadas para determinar si hay una compensación de ruta en otra ruta. En estos casos, puede recomendarse un régimen de terapia de combinación, o intercambiar terapias del todo. Por ejemplo, como se ilustra en los Ejemplos 3, 4 y 6 descritos en el presente documento, se utilizan métodos para controlar niveles de PI3K, HER1, HER2, HER3, IGF-1R, AKT y/o ERK activadas en células tumorales de pacientes que reincidieron con terapia contra el cáncer. En estos tumores de pacientes, las rutas de señalización compensatorias no están directamente dirigidas por la terapia cuando se activan (véanse las FIGS 14-17 y 25). Ventajosamente, utilizando los métodos del presente documento, los análisis del perfilado de rutas indican que los pacientes pueden beneficiarse clínicamente de la terapia inhibidora de PI3K o de la terapia de combinación con el inhibidor de PI3K.

Los análisis de expresión de proteínas dianas o mutación genética solo tienen limitaciones para seleccionar el régimen de terapia apropiado con una eficacia clínica máxima para un sujeto con cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. El perfilado exhaustivo de la dimerización de RTK y la formación de complejos de PI3K proporcionan información reveladora sobre la eficacia de agentes específicos contra el cáncer sobre sus proteínas diana a las que se dirigen. Los métodos de la presente invención también proporcionan información valiosa con respecto a posibles mecanismos de resistencia a fármacos, tales como activación de rutas compensatorias y proporcionan una guía para tratamientos terapéuticos eficaces y regímenes para pacientes con cáncer.

IV. Señalización de PI3K y cáncer

El estado de activación de la ruta de PI3K y/o de las rutas de RTK (por ejemplo, las rutas de HER1, HER2, HER3, HER4, cMET e IGF-1R) puede medirse cuantitativamente en células tumorales procedentes de un paciente con cáncer de tumor sólido, tal como cáncer de mama, colorrectal, gástrico, de pulmón o pancreático. Se desvela un método para la cuantificación simultánea del nivel de activación de numerosas proteínas de la ruta de PI3K en una muestra tumoral.

Se ha descubierto que las fosfoinositida 3-quinazas (PI3K) desempeñan funciones clave en muchos procesos celulares, incluyendo supervivencia, proliferación, diferenciación, metabolismo y motilidad celular. Como efectoras principales aguas abajo de receptores tirosina quinasa (RTK) y de receptores acoplados a proteína G, las PI3K transducen señales desde diversos factores de crecimiento y citocinas en mensajes intracelulares generando fosfolípidos, que, a su vez, activan la serina/treonina quinasa AKT y otras rutas efectoras. Como ejemplos de otras proteínas efectoras aguas abajo, se incluyen, sin limitación, RAC1, SGK, PKC, Mdm2, FKHR, NF- κ B, BAD, MEK, PTEN, GSK3 β , mTOR y S6K.

Cuando las PI3K se activan mediante estimulación de factores de crecimiento a través de los RTK (por ejemplo, HER1, HER2, HER3 y HER4), la subunidad p85 de PI3K se une directamente a los restos de fosfotirosina en los RTK y/o en proteínas adaptadoras. Esta unión libera la inhibición intermolecular de la subunidad p110 de PI3K mediante p85 y localiza a PI3K en la membrana plasmática de la célula. Allí, la PI3K cataliza la fosforilación de PIP2 a PIP3 que después facilita la fosforilación de AKT. La AKT activada fosforila muchas otras proteínas en rutas asociadas/adyacentes que inician procesos que permiten la supervivencia, la supresión de la apoptosis y el control del ciclo celular.

Además de la complejidad de la ruta PI3K, existen abundantes interferencias con otros circuitos de señalización celular. Estos circuitos de señalización asociados o adyacente incluyen, pero sin limitación, las rutas mTOR, p53, RAS y MAPK. La expresión y/o activación aberrante de los componentes de la ruta PI3K, así como de las rutas de la familia de ErbB, se ha notificado en diversos tumores humanos, incluyendo cáncer de mama, de ovario, cáncer gástrico, de pulmón y colorrectal. Se desvela que los métodos se utilizan para detectar, en un extracto celular de células tumorales, tales como de células de cáncer de mama, de pulmón, de cáncer pancreático, gástrico, colorrectal u otras células cancerosas, la presencia de dimerización, el nivel de expresión y/o el estado de activación de una o

más de las moléculas de transducción de señal (por ejemplo, un receptor tirosina quinasa, tal como un elemento de la familia de ErbB o un componente de la ruta de señalización, tal como PI3K).

Adicionalmente el método puede comprender análisis de mutación somática (por ejemplo, variante alélica) para detectar la presencia de una o más mutaciones somáticas poco habituales, en un extracto celular de células tumorales, tales como de cáncer de mama, de pulmón, pancreático, gástrico, colorrectal u otras células cancerosas. Como ejemplos no limitantes de genes portadores de una mutación somática se incluyen PI3K, KRAS y BRAF. Por ejemplo, mutaciones somáticas en el gen de PIK3CA incluyen mutaciones E542K, E545D, E545K y H1047R. En la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/525,137 y en el documento PCT/US2012/051442 se desvelan métodos para detectar variantes alélicas.

Como un ejemplo no limitante, los análisis de mutación somática (por ejemplo, variante alélica) para amplificar una secuencia específica de alelo pueden comprender: (a) la hibridación de un cebador específico de alelo con una primera molécula de ácido nucleico que comprenda un alelo diana; (b) la hibridación de una sonda bloqueadora específica de alelo con una segunda molécula de ácido nucleico que comprenda un alelo alternativo, en el que el alelo alternativo se corresponde con los mismos locus que los del alelo diana; (c) la hibridación de una sonda detectora específica de locus con la primera molécula de ácido nucleico; (d) la hibridación de un cebador específico de locus con el producto de extensión del cebador específico de alelo; y (e) amplificación por PCR del alelo diana. Se desvela que la sonda bloqueadora específica de alelo puede comprender un grupo funcional bloqueador no extensible en el extremo 3'. Tanto el cebador específico de alelo como la sonda bloqueadora específica de alelo pueden comprender una base modificada en la posición del alelo diana y del alelo alternativo, respectivamente. Véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/525.137 y el documento PCT/US2012/051442.

V. Matrices de anticuerpos

En determinados aspectos, la presencia de dimerización, nivel de expresión y/o estado de activación de una o más (por ejemplo, una pluralidad) moléculas de transducción de señal (por ejemplo, un receptor tirosina quinasa tal como HER2 u otros elementos de la familia ErbB, o un componente de la ruta de señalización tal como PI3K) en un extracto celular de células tumorales, tal como células de cáncer de mama, de pulmón u otras células cancerosas, se detecta usando una matriz basada en anticuerpos, que comprende una serie de diluciones de anticuerpos de captura retenidos en un soporte sólido. Las matrices comprenden generalmente una pluralidad de anticuerpos de captura diferentes en un intervalo de concentraciones de anticuerpos de captura que se acoplan a la superficie del soporte sólido en diferentes lugares localizables.

Se desvela una matriz localizable que tiene un intervalo dinámico superior que comprende una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura retenidos en un soporte sólido, en el que los anticuerpos de captura en cada serie de dilución son específicos para uno o más analitos que corresponden a un componente de una ruta de transducción de señal y a otras proteínas diana. En diversos aspectos, estas matrices pueden comprender componentes de rutas de transducción de señal características de tumores particulares, por ejemplo, rutas de transducción de señal activas en células de cáncer de mama (por ejemplo, la ruta HER). Por tanto, el método puede llevarse ventajosamente a la práctica, en el que cada molécula de transducción de señal u otra proteína de interés con un posible defecto de expresión o activación causando cáncer se representa en una sola matriz o microplaca. En algunos aspectos, los componentes de una ruta de transducción de señal determinada, activa en una célula tumoral particular, se disponen en una secuencia lineal que se corresponde con la secuencia en la cual la información se transmite a través de una ruta de transducción de señal dentro de una célula. En el presente documento se describen ejemplos de dichas matrices y se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 8.163.499 y en la Publicación PCT N° WO2009/108637. Los anticuerpos de captura específicos para uno o más componentes de una ruta de transducción de señal determinada, activa en una célula tumoral, también pueden imprimirse de una manera aleatorizada para minimizar cualquier artefacto relacionado con la superficie.

El soporte sólido puede comprender cualquier sustrato adecuado para inmovilizar proteínas. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio), plástico, microplacas, pines, filtros, perlas, papel, membranas, haces de fibra, geles, metal, cerámica y similar. Las membranas, tales como de nylon (Biotrans™, ICN Biomedicals, Inc. (Costa Mesa, CA); Zeta-Probe®, Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)), de nitrocelulosa (Protran®, Whatman Inc. (Florham Park, NJ)) y de PVDF (Immobilon™, Millipore Corp. (Billerica, MA)) son idóneas para su uso como soportes sólidos en las matrices. Preferentemente, los anticuerpos de captura están retenidos en portaobjetos de vidrio recubiertos con un polímero de nitrocelulosa, por ejemplo, portaobjetos FAST®, que se encuentran disponibles en el comercio de Whatman Inc. (Florham Park, NJ).

Los aspectos particulares, deseables, del soporte sólido, incluyen la capacidad de unir grandes cantidades de anticuerpos de captura y la capacidad de unir anticuerpos de captura con desnaturalización mínima. Otro aspecto adecuado es que el soporte sólido presenta una "capilaridad" mínima cuando se aplican a un soporte las soluciones de anticuerpo que contienen los anticuerpos de captura. Un soporte sólido con capilaridad mínima permite aplicar al soporte pequeñas partes alicuotas de solución del anticuerpo de captura para producir manchas pequeñas, definidas, del anticuerpo de captura inmovilizado.

Los anticuerpos de captura están generalmente, directa o indirectamente (por ejemplo, mediante etiquetas de captura), retenidos en el soporte sólido mediante interacciones covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces dipolo-dipolo). Los anticuerpos de captura pueden unirse de manera covalente al soporte sólido usando un reticulante homobifuncional o heterobifuncional, usando métodos y condiciones de reticulación convencionales. Los reticulantes adecuados se encuentran disponibles en proveedores, tales como, por ejemplo, Pierce Biotechnology (Rockford, IL).

Los métodos para generar matrices incluyen, pero sin limitación, cualquier técnica que se utilice para construir matrices de proteínas o de ácidos nucleicos. Los anticuerpos de captura pueden aplicarse sobre una matriz usando un microaplicador, que son generalmente impresoras robóticas de punta fina y punta gruesa, o impresoras de chorro de tinta. Los sistemas robóticos adecuados para imprimir matrices de anticuerpos descritos en el presente documento incluyen el robot PixSys 5000 (Cartesian Technologies; Irvine, CA) de punta fina ChipMaker2 (TeleChem International; Sunnyvale, CA) así como otras impresoras robóticas disponibles en BioRobics (Woburn, MA) y Packard Instrument Co. (Meriden, CT). Preferentemente, sobre la matriz se aplican al menos 2, 3, 4, 5 o 6 copias de cada dilución de anticuerpo de captura.

Otro método para generar matrices, adecuado para su uso en la presente invención, comprende dispensar un volumen conocido de una dilución de anticuerpo de captura a cada posición de la matriz seleccionada, poniendo en contacto un dispensador capilar sobre un soporte sólido en condiciones eficaces para extraer un volumen definido de líquido sobre el soporte, en el que este proceso se repite usando diluciones de anticuerpo de captura seleccionadas en cada posición de matriz seleccionada para crear una matriz completa. El método puede realizarse formando una pluralidad de dichas matrices, en el que la etapa de depositar la solución, se aplica a una posición seleccionada de cada uno de una pluralidad de soportes sólidos a cada ciclo repetido. Una descripción adicional de dicho método puede encontrarse, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.807.522.

En determinados casos, para generar las matrices de anticuerpo, pueden utilizarse dispositivos para imprimir en papel. Por ejemplo, la dilución del anticuerpo de captura deseado puede cargarse en el cabezal de impresión de una impresora a chorro de escritorio e imprimirse sobre un soporte sólido adecuado (véase, por ejemplo, Silzel *et al.*, Clin. Chem., 44: 2036-2043 (1998)).

La matriz generada sobre el soporte sólido puede tener una densidad de al menos aproximadamente 5 manchas/cm², y preferentemente de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 o 9000 o 10.000 manchas/cm².

En determinados casos, cada una de las manchas sobre el soporte sólido representa un anticuerpo de captura diferente. En otros casos determinados, las manchas múltiples sobre el soporte sólido representan el mismo anticuerpo de captura, por ejemplo, como una serie de dilución que comprende una serie de concentraciones descendientes del anticuerpo de captura.

Ejemplos adicionales de métodos para preparar y construir matrices de anticuerpo sobre soportes sólidos se describen en las Patentes de Estados Unidos N° 6.197.599, 6.777.239, 6.780.582, 6.897.073, 7.179.638, 7.192.720 y 7.771.955; en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20060115810, 20060263837 y 20070054326; y en Varnum *et al.*, Methods Mol. Biol., 264:161-172 (2004).

En la técnica se conocen métodos de escaneo de matrices de anticuerpo e incluyen, sin limitación, cualquier técnica usada para escanear matrices de proteínas o de ácidos nucleicos. Los escáneres de micromatrices se encuentran disponibles en PerkinElmer (Boston, MA), Agilent Technologies (Palo Alto, CA), Applied Precision (Issaquah, WA), GSI Lumonics Inc. (Billerica, MA), y Axon Instruments (Union City, CA). Como un ejemplo no limitante, puede usarse un GSI ScanArray3000 para la detección con fluorescencia con el programa informático ImaGene para la cuantificación.

A. Ensayos de detección de dimerización

Se desvela un ensayo para detectar y/o cuantificar la homo o heterodimerización de los receptores tirosina quinasa que incluyen, sin limitación, dímeros HER1/HER2, dímeros HER1/HER3, dímeros HER2/HER3, dímeros HER2/HER2, dímeros HER2/HER4, dímeros p95HER2/HER3, dímeros p95HER2/HER2 y similares. Un homodímero está formado por dos moléculas idénticas, tales como, HER2/HER2, en un proceso denominado homodimerización, mientras que un heterodímero está formado por dos moléculas diferentes, tales como, HER1/HER3, en un proceso denominado heterodimerización. En este aspecto, el ensayo comprende tres anticuerpos: (1) un anticuerpo de captura específico de un elemento del par del dímero; (2) un primer anticuerpo de detección específico de un primer elemento del par del dímero, en el que el primer anticuerpo de detección es específico de un dominio diferente al del anticuerpo de captura; y (3) un segundo anticuerpo de detección específico de un segundo elemento del par del dímero.

Algunas de las técnicas CEER se desvelan en la Patente de Estados Unidos Nº 8.163.299 y en las publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos 20080261829, 20090035792, 20100167945, 20110071042 y 20110281748. Pueden encontrarse detalles adicionales, por ejemplo, en los documentos WO 2010/132723 y WO 2011/008990.

La FIG. 1A-C muestra una variante del ensayo de proximidad anterior para la detección de la dimerización de los receptores tirosina quinasa. Como se muestra en la FIG. 1A, se usa un anticuerpo de captura 112 para capturar un elemento del dímero de RTK, por ejemplo HER2 113. Después, se usa un primer anticuerpo de detección 115 para unirse a una parte diferente (por ejemplo, al epítipo) en HER2. Después de esto, se usa un segundo anticuerpo de detección 120 que se une al segundo receptor tirosina quinasa dimerizado, por ejemplo, HER3 125. El primer anticuerpo de detección comprende uno o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de un estado de activación, específicos de un elemento del dímero, mientras que un segundo anticuerpo de detección o una pluralidad de segundos anticuerpos de detección son específicos del otro elemento del dímero. El primer anticuerpo de detección se marca con un grupo funcional facilitador, por ejemplo, glucosa oxidasa (GO) y el segundo anticuerpo de detección se marca con un primer elemento de un par de amplificación de señal, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP). El grupo funcional facilitador genera un agente oxidante, por ejemplo, peróxido de hidrógeno, que se dirige hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal. Después de esto, la pluralidad de analitos capturados detectables se incuban con un segundo elemento del par de amplificación de señal, por ejemplo, tiramida o tiramida-biotina para generar una señal amplificada, que después se detecta. En las FIGS. 1B y 1C, respectivamente, se muestran otros ejemplos de heterodímeros, tales como un dímero HER2/HER1 y un dímero HER3/HER1.

Los anticuerpos adecuados independientes de un estado de activación para medir la dimerización de receptores tirosina quinasa, incluyen cualquier anticuerpo que se una a un epítipo de un receptor tirosina quinasa que tenga un resto de aminoácido que no se haya activado (por ejemplo, fosforilado). Los anticuerpos independientes de un estado de activación que se unen a las RTK, tales como elementos de la familia ErbB, cMET, IGF-1R y similares se encuentran disponibles en el comercio, pero sin limitación, de Cell Signaling Technology (Danvers, MA), Thermo Scientific (Waltham, MA), Abcam (Cambridge, MA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y EMD Millipore (Billerica, MA).

Los anticuerpos adecuados dependientes de un estado de activación para medir la dimerización de receptores tirosina quinasa, incluyen cualquier anticuerpo que se una a un epítipo de un receptor tirosina quinasa que tenga un resto de aminoácido que se haya activado (por ejemplo, fosforilado). Los anticuerpos dependientes de un estado de activación que se unen a las RTK, tales como elementos de la familia ErbB, cMET, IGF-1R y similares que son idóneos para su uso en la presente invención, se encuentran disponibles en el comercio, pero sin limitación, de Cell Signaling Technology (Danvers, MA), Thermo Scientific (Waltham, MA), Abcam (Cambridge, MA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y EMD Millipore (Billerica, MA).

Se desvela un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, cáncer, comprendiendo el método:

(a) medir la dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK), en el que la medición comprende: (i) incubar un extracto celular con una o con una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados; (ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con los anticuerpos de detección que comprenden un primer o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de un estado de activación y un segundo o una pluralidad de segundos anticuerpos independientes de un estado de activación, específico de un primer elemento y de un segundo elemento, respectivamente, de un par de analitos dimerizado para formar una pluralidad de analitos dimerizados capturados detectables, en el que los primeros anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con un primer elemento de un par de amplificación de señal, y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se dirige hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal; (iii) incubar la pluralidad de analitos dimerizados capturados detectables, con un segundo elemento del par de amplificación de señal, para generar una señal amplificada; y (iv) detectar la señal amplificada generada del primer y segundo elemento del par de amplificación de señal; y

(b) seleccionar un fármaco contra el cáncer comparando la dimerización de al menos dos RTK con un perfil de dimerización de referencia de las mismas dos RTK en el que el perfil de dimerización de referencia se genera en ausencia del agente contra el cáncer.

Adicionalmente el método puede comprender calibrar el nivel de dimerización de al menos dos RTK con respecto a una curva patrón generada por al menos dos RTK.

El extracto celular puede aislarse de un sujeto que tiene cáncer después de la administración de un fármaco contra el cáncer. El extracto celular puede ponerse en contacto con un fármaco contra el cáncer. El fármaco contra el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en: un compuesto modulador de PI3K, un compuesto modulador de RTK, o una combinación de los mismos.

La cantidad de señal amplificada puede ser correlativa a la cantidad de receptor tirosina quinasa dimerizado.

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

Se desvelan diversos grupos funcionales facilitadores. Un grupo funcional facilitador adecuado incluye cualquier molécula que pueda generar un agente oxidante que se canalice hacia (es decir, se dirija a) y reaccione con (es decir, se una a, esté unido por, o forme un complejo con) otra molécula en proximidad (es decir, espacialmente cerca o próxima) al grupo funcional facilitador. Como ejemplos de grupos funcionales facilitadores se incluyen, sin limitación, enzimas tales como glucosa oxidasa o cualquier otra enzima que catalice una reacción de oxidación/reducción que implique oxígeno molecular (O_2) como el aceptor de electrones y fotosensibilizadores, tales como, azul de metileno, rosa de Bengala, porfirinas, colorantes de escualano, ftalocianinas y similares. Los ejemplos no limitantes de agentes oxidantes incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un oxígeno singlete, o cualquier otro compuesto que transfiera átomos de oxígeno o gane electrones en una reacción de oxidación/reducción. Preferentemente, en presencia de un sustrato adecuado (por ejemplo, glucosa, luz, etc.), el grupo funcional facilitador (por ejemplo, glucosa oxidasa, fotosensibilizador, etc.) genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un oxígeno singlete, etc.) que se canalice hacia, y reaccione con, el primer elemento del par de amplificación de señal (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP), hapteno protegido por un grupo protector, una enzima inactivada por enlace tioéter con un inhibidor enzimático, etc.) cuando los dos grupos funcionales están próximos entre sí.

Los elementos de pares de amplificación de señal adecuados incluyen, pero sin limitación, peroxidasas, tales como peroxidasa de rábano picante (HRP), catalasa, cloroperoxidasa, citocromo c peroxidasa, peroxidasa eosinófila, glutatión peroxidasa, lactoperoxidasa, mieloperoxidasa, peroxidasa de tiroides, desyodinasas, y similares. Otros ejemplos de elementos de pares de amplificación de señal incluyen haptenos protegidos con un grupo protector y enzimas inactivadas por enlace tioéter con un inhibidor enzimático.

En un ejemplo de canalización de proximidad, el grupo funcional facilitador es glucosa oxidasa (GO) y el primer elemento del par de amplificación de señal es peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato, tal como glucosa, se genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Si la HRP está en la canalización de proximidad a la GO, el H_2O_2 generado por la GO se canaliza hacia, y forma complejos con, la HRP para formar un complejo HRP- H_2O_2 , que, en presencia del segundo elemento del par de amplificación de señal (por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico tal como tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida), ácido homovanílico o ácido 4-hidroxifenilacético), genera una señal amplificada. Cuando se utiliza biotina-tiramida como el segundo elemento del par de amplificación de señal, el complejo HRP- H_2O_2 oxida la tiramida para generar un radical de tiramida reactivo que une covalentemente restos nucleófilos adyacentes. La tiramida activada se detecta directamente o después de la adición de un reactivo de detección de señal, tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con estreptavidina y un reactivo cromogénico. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, un colorante Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraarrodamina (TRITC), un flúor CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similar. El marcador de estreptavidina puede acoplarse directa o indirectamente al fluoróforo o a la peroxidasa usando métodos bien conocidos en la técnica. Como ejemplos no limitantes de reactivos cromogénicos se incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), 2,2'-acino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN), y/o porfirógeno.

En otro ejemplo de canalización por proximidad, el grupo funcional facilitador es un fotosensibilizador y el primer elemento del par de amplificación de señal es una molécula grande marcada con haptenos múltiples que están protegidos con grupos protectores que impiden la unión de los haptenos con un compañero de unión específico (por ejemplo, ligando, anticuerpo, etc.). Por ejemplo, el elemento del par de amplificación de señal puede ser una molécula de dextrano marcada con moléculas de biotina, coumarina y/o fluoresceína protegidas. Como grupos protectores adecuados se incluyen, pero sin limitación, grupos fenoxi-, analino-, olefin-, tioéter- y selenoéter. En la Patente de Estados Unidos N° 5.807.675 se describen fotosensibilizadores y moléculas marcadas con haptenos protegidos, adicionales, adecuados para su uso en el ensayo de proximidad. Cuando el fotosensibilizador se excita con luz, genera un agente oxidante (es decir, un oxígeno singlete). Si las moléculas de hapteno están en la proximidad de canalización al fotosensibilizador, el oxígeno singlete generado por el fotosensibilizador se canaliza hacia, y reacciona con, tioéteres en los grupos protectores de los haptenos para dar lugar a grupos carbonilo (cetonas o aldehídos) y a ácido sulfínico, liberando los grupos protectores de los haptenos. Los haptenos desprotegidos se encuentran después disponibles para unirse específicamente con el segundo elemento del par de amplificación de señal (por ejemplo, un compañero de unión específico que puede generar una señal detectable). Por ejemplo, cuando el hapteno es biotina, el compañero de unión específico puede ser una estreptavidina marcada con enzimas. Las enzimas ejemplares incluyen fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, HRP, etc. Después de lavar para retirar los reactivos no unidos, la señal detectable puede generarse añadiendo un sustrato detectable (por ejemplo, fluorescente, quimioluminiscente, cromogénico, etc.) de la enzima y detectarse usando cualquiera de los métodos e instrumentación adecuados conocidos en la materia. Como alternativa, la señal detectable puede amplificarse

usando amplificación de señal con tiramida y la tiramida activada puede detectarse bien directamente o detectarse después de la adición de un reactivo detector de señales, como se ha descrito anteriormente.

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

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

El extracto celular puede comprender un extracto de células aislado de una muestra. En determinados casos, la muestra se selecciona de sangre entera, suero, plasma, aspirado con aguja fina (AAF), orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado de pezón, linfa, saliva y combinaciones de los mismos. La muestra puede obtenerse de un paciente que tenga cáncer de tumor sólido. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de mama, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico), cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal y combinaciones de los mismos.

En algunos casos, el extracto celular se aísla de un paciente con cáncer después de recibir terapia farmacológica contra el cáncer. En determinados casos, las células aisladas se ponen en contacto con un fármaco contra el cáncer o con una combinación de fármacos contra el cáncer. En algunos casos, un fármaco contra el cáncer incluye un compuesto inhibidor de PI3K o modulador RTK, tal como HER1, HER2, HER3, cMET o inhibidor de IGF-1R). En otros casos, las células aisladas se incuban con un fármaco contra el cáncer o con una combinación de fármacos contra el cáncer antes de la estimulación del factor de crecimiento. En otros casos adicionales, se produce la lisis de células aisladas después de la estimulación del factor de crecimiento, para producir el extracto celular.

Los métodos pueden ser particularmente útiles para determinar la activación (por ejemplo fosforilación) de RTK, de una o más RTK oncogénicas (por ejemplo HER1, HER2, HER3, p95HER2, cMET e IGF-1R) en pacientes que están en riesgo de desarrollar, que se sospecha que tienen, o a los que se les ha diagnosticado, un cáncer de tumor sólido, tal como cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, cáncer de pulmón o pancreático. En determinados casos, los métodos pueden ayudar, dar asistencia, o facilitar, a realizar el diagnóstico y el pronóstico de un cáncer en un sujeto, midiendo los RTK activadas (por ejemplo, fosforiladas) (por ejemplo, niveles de fosfo-HER2) para determinar si el sujeto expresa una forma activada de una o más de la familia de proteínas de RTK (por ejemplo, un paciente positivo a HER2). Los métodos pueden realizarse en un sujeto en el que ya se ha determinado que expresa una o más proteínas oncogénicas, para optimizar la terapia, reducir la toxicidad, monitorizar la eficacia del tratamiento terapéutico y/o detectar una no sensibilidad adaptativa a la terapia.

Los métodos pueden comprender adicionalmente determinar el estado de activación de una o más proteínas efectoras y adaptadoras de la ruta RTK, y/o una ruta asociada o compensatoria. En algunos casos, la ruta asociada o compensatoria está mal regulada después de la adaptación del tumor a la terapia contra el cáncer.

B. Ensayos de detección para un complejo PI3K

Se sabe por ejemplo, que la activación de HER3 da como resultado la activación de PI3K. Sin embargo, sorprendentemente ahora se ha descubierto que, en determinados casos y en determinadas condiciones, la fosforilación de HER3 y la fosforilación de PI3K se producen de manera simultánea. Usando los ensayos descritos en el presente documento, es posible detectar y cuantificar la cantidad del complejo DE PI3K y la cantidad de activación y/o fosforilación de un complejo DE PI3K. El complejo DE PI3K comprende i) un par receptor tirosina quinasa dimerizado; ii) una subunidad p85 y una subunidad p110 (por ejemplo α o β) de PI3K. El ensayo comprende tres anticuerpos: (1) un anticuerpo de captura específico para la subunidad p85 o la una subunidad p110 de PI3K; (2) un primer anticuerpo de detección específico de un primer elemento del par de dímeros, o la subunidad PI3K, en el que el primer anticuerpo de detección es específico de un dominio diferente al del anticuerpo de captura y en el que la subunidad PI3K puede estar activada; y (3) un segundo anticuerpo de detección específico de un segundo elemento del par de dímeros o una subunidad de PI3K.

La FIG. 2 muestra un complejo de PI3K, 210, detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. En esta figura, (1) la subunidad p85 de PI3K, 212, está unida por el anticuerpo de captura, 220; (2) un

primer anticuerpo de detección, 250, es específico de la subunidad α o β de p110 de PI3K; y (3) un segundo anticuerpo de detección, 230, es específico de un primer elemento del par de dímeros.

La FIG. 3 muestra un complejo PI3K activado, 310, detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. En esta figura, (1) la subunidad p85 de PI3K, está unida al anticuerpo de captura, 320; (2) un primer anticuerpo de detección, 360, es específico de la subunidad α o β de p110 de PI3K; y (3) un segundo anticuerpo de detección comprende un anticuerpo dependiente de un estado de activación 330, específico de un sitio de fosforilación en una subunidad de PI3K, tal como p85 (por ejemplo, Y452, Y458, Y460, Y463, Y467, Y688, Y470, u otro sitio pTyr).

La FIG. 4A muestra otro complejo adicional PI3K activado, detectable por los métodos y ensayos descritos en el presente documento. En la figura mostrada en la FIG. 4A (1) la subunidad p85 de PI3K está unida por el anticuerpo de captura 421; (2) un primer anticuerpo de detección 430 comprende un anticuerpo independiente de un estado de activación específico de un elemento de un receptor tirosina quinasa dimerizado (por ejemplo, HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R y similar); y (3) un segundo anticuerpo de detección, 450, comprende un anticuerpo dependiente de un estado de activación específico de un sitio de fosforilación en una subunidad de PI3K, tal como p85 (por ejemplo, Y452, Y458, Y460, Y463, Y467, Y688, Y470, u otro sitio pTyr).

La FIG. 4B muestra incluso otro complejo PI3K detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. En la FIG. 4B (1) la subunidad p85 de PI3K está unida por el anticuerpo de captura 452; (2) un primer anticuerpo de detección 471 que comprende un anticuerpo independiente de un estado de activación específico de un elemento de un receptor tirosina quinasa dimerizado (por ejemplo, HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R y similar); y (3) un segundo anticuerpo de detección 491 comprende un anticuerpo independiente de un estado de activación específico del otro elemento del par dimerizado.

La FIG. 4C ilustra la detección de complejos PI3K activados en células T47D (línea de células tumorales epiteliales de mama ductal humano) tratadas con herregulina (HRG), en comparación con células no tratadas. La detección de complejos PI3K también puede correlacionarse con la detección de PI3K activado (por ejemplo, fosforilado).

La FIG. 5A muestra otro complejo PI3K detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. En la FIG. 5A (1) la subunidad p110 de PI3K está unida por el anticuerpo de captura 501; (2) un primer anticuerpo de detección 515 comprende un anticuerpo independiente de un estado de activación específico de un elemento de un receptor tirosina quinasa dimerizado (por ejemplo, HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R y similar); y (3) un segundo anticuerpo de detección 525 que comprende un anticuerpo dependiente de un estado de activación específico de un sitio de fosforilación sobre una subunidad PI3K tal como p85 (por ejemplo, Y452, Y458, Y460, Y463, Y467, Y688, Y470, u otro sitio pTyr). En determinados aspectos, la captura de p85 para detectar fosfo-PI3K es más sensible que la captura de p110.

La FIG. 5B muestra un complejo PI3K detectable mediante los métodos y ensayos descritos en el presente documento. En la FIG. 5B (1) la subunidad p85 de PI3K está unida por el anticuerpo de captura 530; (2) un primer anticuerpo de detección 550 comprende un anticuerpo independiente de un estado de activación específico de un elemento de un dímero de un receptor tirosina quinasa (por ejemplo, HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R y similar); y (3) un segundo anticuerpo de detección 562 comprende un anticuerpo dependiente de un estado de activación específico de un sitio de fosforilación en una subunidad PI3K tal como p85 (por ejemplo, Y452, Y458, Y460, Y463, Y467, Y688, Y470, u otro sitio pTyr).

Como anticuerpo adecuado para medir el nivel de un complejo PI3K se incluye cualquier anticuerpo que sea específico de (es decir que reconozca, se una a, o forme un complejo con) un epítipo de la subunidad p110 de PI3K (por ejemplo, α o β), la subunidad p85 de PI3K, o el par de receptores tirosina quinasa dimerizado.

Los anticuerpos adecuados, independientes de un estado de activación, se unen a un epítipo en la subunidad p110 de PI3K, en la subunidad p85 de PI3K o en el par de receptores tirosina quinasa dimerizado, en el que el epítipo carece de restos de aminoácidos fosforilados. Dichos anticuerpos independientes de un estado de activación incluyen anticuerpos de subunidad p85 de PI3K (Cat. n° 4257, N° 4292 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-12929, sc-56934, sc-56938, sc-71892, sc-71891, y sc-376112, sc-292114, y sc-131325 de Santa Cruz Biotechnology; Cat. Nos ab86714, ab22653, ab40755, ab250, ab135253, ab71925, ab63040, ab90578, ab133595, ab135952, ab65261, y ab71522 de Abcam), los anticuerpos de subunidad α de p110 de PI3K (Cat. n° 4249 y n° 4249 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-7248, sc-7189, sc-8010, sc-7174, sc-1332, sc-1331), y los anticuerpos de la subunidad β de p110 de PI3K (Cat. n° 3011 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-7248, sc-7189, sc-8010, sc-376641, sc-376412, sc-376492, sc-603, sc-7175, sc-602 de Santa Cruz Biotechnology; Cat. Nos ab32569, ab55593, ab97322, y ab32874 de Abcam).

Los anticuerpos adecuados, independientes de un estado de activación específicos de los RTK dimerizados incluyen anticuerpos contra HER1 (Cat. N° 2646, N° 2239, N° 2239, N° 2963, N° 3265, y N° 2232 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-374607, sc-365829, sc-80543, sc-120, sc-03, sc-101, sc-373476, sc-31155, sc-71031, sc-

81451 y sc-71037 de Santa Cruz Biotechnology), anticuerpos contra HER2 (Cat. N° 2165, N° 2248, N° 3250 y N° 2242 de Cell Signaling Technology), anticuerpos contra HER3 (Cat. N° 4754 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-415, sc-7390, sc-292557, sc-81455, sc-81454, sc-71067, sc-53279, y sc-285 de Santa Cruz Biotechnology), y anticuerpos contra HER4 (Cat. n° 4795 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-31150, sc-8050, sc-81456, sc-71071, sc-71070, sc-53280, sc31151, sc-283, y sc-31149 de Santa Cruz Biotechnology).

Se desvela un anticuerpo que se une a la subunidad α de p110. También puede usarse un anticuerpo que se une a la subunidad β de p110. Los anticuerpos adecuados dependientes de un estado de activación contra PI3K se describen en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20080014595. Los anticuerpos contra PI3K se encuentran también disponibles, pero sin limitación, en el comercio de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), BD Biosciences (San José, CA), Thermo Scientific (Waltham, MA), Abcam (Cambridge, MA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), y EMD Millipore (Billerica, MA).

Por ejemplo, los anticuerpos adecuados dependientes de un estado de activación se unen a un epítipo en la subunidad p110 o en la subunidad p85 de PI3K, en el que el epítipo tiene al menos un resto de aminoácido fosforilado (por ejemplo, pTyr). Dichos anticuerpos dependientes de un estado de activación incluyen un anticuerpo p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) de p-PI3K (Cat. n° 4228 de Cell Signaling Technology), un anticuerpo p85 (Tyr67) de p-PI3K (Cat. n° sc-293115 de Santa Cruz Biotechnology), y un anticuerpo p85 (Tyr607) de p-PI3K (Cat. n° ab61801 de Abcam). En la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20080014595 se describen anticuerpos p85 fosfo-PI3K. Del mismo modo, se describen anticuerpos p110 de PI3K en la Patente de Estados Unidos N° 6.274.327.

Los anticuerpos específicos contra antígenos de PI3K (SEC ID Nos: 10-12) o fragmentos de los mismos, pueden usarse en los métodos para medir la formación de complejos de PI3K.

Los anticuerpos dependientes de un estado de activación, adecuados para medir la dimerización de receptores tirosina quinasa, incluyen cualquier anticuerpo que se una a un epítipo de un receptor tirosina quinasa que tenga un resto de aminoácido que se haya activado (por ejemplo fosforilado). Los anticuerpos dependientes de un estado de activación que se unen a los RTK, tales como elementos de la familia ErbB, cMET, IGF-1R y similar se encuentran disponibles en el comercio, pero sin limitación, de Upstate (Temecula, CA), Biosource (Camarillo, CA), Cell Signaling Technologies (Danvers, MA), R&D Systems (Minneapolis, MN), Lab Vision (Fremont, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), BD Biosciences (San José, CA), Thermo Scientific (Waltham, MA), Abcam (Cambridge, MA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), y EMD Millipore (Billerica, MA).

Por ejemplo, los anticuerpos adecuados dependientes de un estado de activación específicos de RTK dimerizados incluyen anticuerpos contra HER1 (Cat. n° 8808, n° 3056, n° 6963, n° 2231, n° 2641, n° 2235, n° 2237, n° 2238, n° 2236, n° 2234, n° 2220, n° 4404, y N° 4407 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-16802, sc-12351, sc-16804, sc-16803, sc-101665, sc101668, sc-101667, y sc-101669 de Santa Cruz Biotechnology), anticuerpos contra HER2 (Cat. n° 2244, n° 2241, n° 6942, n° 2249, y n° 2247 de Cell Signaling Technology), anticuerpos contra HER3 (Cat. n° 4561, n° 4787, n° 4791, n° 2842 y n° 8017 de Cell Signaling Technology; Cat. n° sc-135654 de Santa Cruz Biotechnology), y anticuerpos contra HER4 (Cat. n° 3790 y n° 4757 de Cell Signaling Technology; Cat. Nos sc-33040 y sc-81491 de Santa Cruz Biotechnology).

El ensayo de proximidad para medir (por ejemplo, detectar y cuantificar) el nivel de un complejo PI3K, en el que el complejo PI3K comprende a) un par de receptores tirosina quinasa dimerizado; b) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K, puede comprender:

(i) incubar un extracto celular con una o una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados;

(ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con primeros anticuerpos de detección que comprenden a) un primer o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de un estado de activación específicos de un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado o b) una subunidad p110 de PI3K; y segundos anticuerpos de detección que comprenden cualquiera de a) un segundo o una pluralidad de segundos anticuerpos independientes de un estado de activación específicos de a) un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado, una subunidad p110 o p85 de PI3K o b) anticuerpos dependientes de un estado de activación específicos de la subunidad p85 de PI3K y/o de la subunidad p110 de PI3K para formar una pluralidad de analitos formando complejos y dimerizados capturados detectables,

en el que los primeros anticuerpos de detección están marcados con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos de detección están marcados con un primer elemento de un par de amplificación de señal, y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se canaliza hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal;

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

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

Se desvela un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, cáncer, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de una activación del complejo de PI3K, en el que dicho complejo de PI3K comprende i) la dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK); ii) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K, comprendiendo dicha medición:

(i) incubar un extracto celular con una o una pluralidad de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados; (ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con primeros anticuerpos de detección que comprendan cualquiera de a) un primer o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de estado de activación específicos de un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado o b) una subunidad p110 de PI3K; y segundos anticuerpos de detección que comprendan cualquiera de a) un segundo o una pluralidad de segundos anticuerpos independientes de estado de activación específicos de a) un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado; una subunidad p85 o p110 de PI3K o b) anticuerpos dependientes de un estado de activación específicos de una subunidad p85 de PI3K y/o de una subunidad p110 de PI3K para formar una pluralidad de analitos dimerizados y formando complejos capturados detectables, en el que los primeros anticuerpos de detección están marcados con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos de detección están marcados con un primer elemento de un par de amplificación de señal, y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se canaliza hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señales; e incubar la pluralidad de analitos dimerizados capturados con un segundo elemento del par de amplificación de señal para generar una señal amplificada; y detectar la señal amplificada generada del primer y segundo elemento del par de amplificación de señal; y

(b) seleccionar un fármaco contra el cáncer comparando el nivel de activación del complejo PI3K con un perfil de activación del complejo PI3K de referencia en el que el perfil del complejo de referencia se genera en ausencia del fármaco contra el cáncer.

La cantidad de señal amplificada puede ser correlativa con la cantidad de complejo PI3K.

El nivel de complejo PI3K puede calibrarse con respecto a una curva patrón generada para dicho complejo PI3K que comprende i) la dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK); ii) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K.

El nivel de activación del complejo PI3K puede determinarse a) comparando la cantidad de fosfo-PI3K con el nivel total de PI3K presente en la muestra y b) estableciendo una proporción entre el complejo PI3K activado con PI3K total. El nivel de activación del complejo PI3K se determina basándose en la proporción. En algunos casos, el nivel de activación del complejo PI3K está por debajo de un umbral límite, que indica que el sujeto no se estaría beneficiando del tratamiento con el inhibidor de PI3K. En algunos casos, el nivel de activación del complejo PI3K está por encima del umbral límite, lo que indica que el sujeto se estaría beneficiando del tratamiento con el inhibidor de PI3K.

El nivel de activación del complejo PI3K (por ejemplo, complejo PI3K fosforilado) puede indicar que podría seleccionarse un solo inhibidor de PI3K para el sujeto. El nivel de activación del complejo PI3K puede indicar que podría seleccionarse una terapia de combinación que comprendiese un inhibidor de PI3K y otro fármaco contra el cáncer para el sujeto.

El extracto celular puede aislarse de un sujeto con cáncer después de la administración de un fármaco contra el cáncer. El extracto celular puede ponerse en contacto con un fármaco contra el cáncer. El fármaco contra el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en un compuesto modulador de PI3K, un compuesto modulador de RTK o una combinación de los mismos.

Al menos dos RTK pueden ser un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dímero HER1/HER2, un dímero HER1/HER3, un dímero HER2/HER3, un dímero HER2/HER2, un dímero HER2/HER4, un dímero p95HER2/HER3 y un dímero p95HER2/HER2.

Como se ha indicado anteriormente, en un ejemplo de canalización por proximidad, el grupo funcional facilitador es la glucosa oxidasa (GO) y el primer elemento del par de amplificación de señal es la peroxidasa de rábano picante (HRP). Cuando la GO se pone en contacto con un sustrato, tal como glucosa, se genera un agente oxidante (por ejemplo, peróxido de hidrógeno (H_2O_2)). Si la HRP está dentro de la canalización por proximidad con la GO, el H_2O_2 generado por la GO se canaliza hacia, y forma complejos con, la HRP para formar un complejo HRP- H_2O_2 , que, en presencia del segundo elemento del par de amplificación de señal (por ejemplo, un sustrato quimioluminiscente tal como luminol o isoluminol o un sustrato fluorogénico tal como tiramida (por ejemplo, biotina-tiramida), ácido homovanílico o ácido 4-hidroxifenil acético), genera una señal amplificada. Cuando se usa biotina-tiramida como segundo elemento del par de amplificación de señal, el complejo HRP- H_2O_2 oxida la tiramida para generar un radical de tiramida reactivo que une, mediante enlace covalente, restos nucleófilos próximos. La tiramida activada se detecta bien directamente o se detecta después de la adición de un reactivo detector de señal, tal como, por ejemplo, un fluoróforo marcado con estreptavidina o una combinación de una peroxidasa marcada con

estreptavidina y un reactivo cromogénico. Los ejemplos de fluoróforos incluyen, pero sin limitación, un colorante Alexa Fluor® (por ejemplo, Alexa Fluor® 555), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™; rodamina; rojo Texas, isotiocianato de tetrarrodamina (TRITC), un colorante de flúor CyDye™ (por ejemplo, Cy2, Cy3, Cy5) y similar. El marcador de estreptavidina puede acoplarse directa o indirectamente al fluoróforo o a la peroxidasa usando métodos muy conocidos en la técnica. Como ejemplos no limitantes de reactivos cromogénicos se incluyen 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), 3,3'-diaminobencidina (DAB), ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), 4-cloro-1-naftol (4CN), y/o porfirógeno.

El extracto celular puede comprender un extracto de células aislado de una muestra. En algunos casos, la muestra se selecciona de sangre entera, suero, plasma, aspirado con aguja fina (AAF), orina, esputo, fluido de lavado bronquial, lágrimas, aspirado de pezón, linfa, saliva y combinaciones de los mismos. La muestra puede obtenerse de un paciente que tenga un cáncer de tumor sólido. Los ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cáncer de mama, cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma pulmonar no microcítico), cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer colorrectal y combinaciones de los mismos. En algunos casos, el extracto celular se aísla de un paciente con cáncer después de recibir terapia con un fármaco contra el cáncer. En algunos casos, las células aisladas se ponen en contacto con un fármaco contra el cáncer o con una combinación de fármacos contra el cáncer. En algunos casos, un fármaco contra el cáncer incluye un inhibidor de PI3K o un inhibidor de RTK, tal como HER1, HER2, HER3, cMET o inhibidor de IGF-1R). En otros casos, las células aisladas se incuban con un fármaco contra el cáncer o con una combinación de fármacos contra el cáncer antes de la estimulación del factor de crecimiento. Incluso, en otros casos, las células aisladas se someten a lisis después de la estimulación del factor de crecimiento para producir el extracto celular.

Los métodos pueden ser particularmente útiles para determinar la activación (por ejemplo, fosforilación) del complejo PI3K en pacientes que están en riesgo de desarrollar, que se sospecha que tienen, o que se les ha diagnosticado, un cáncer de tumor sólido, tal como cáncer de mama, colorrectal, gástrico, pulmonar o pancreático. En algunos casos, la activación del complejo PI3K comprende una o más RTK activadas (por ejemplo HER1, HER2, HER3, p95HER2, cMET e IGF-1R), una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K. En determinados casos, los métodos ayudan, asisten o facilitan el diagnóstico y pronóstico de un cáncer en un sujeto, midiendo los complejos PI3K activados para determinar si las células tumorales del sujeto expresan un complejo PI3K activado. Los métodos pueden realizarse en un sujeto en el que ya se ha determinado que expresa una o más proteínas oncogénicas, para optimizar la terapia, reducir la toxicidad, controlar la eficacia del tratamiento terapéutico y/o detectar una no sensibilidad adaptativa a la terapia.

En algunos, los métodos comprenden adicionalmente determinar el estado de activación de una o más proteínas de transducción de señal de la ruta PI3K o de una ruta asociada y/o compensatoria. En algunos casos, la ruta asociada o compensatoria está mal regulada después de la adaptación tumoral a la terapia contra el cáncer.

El ensayo con el complejo PI3K puede comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de la subunidad p85 de PI3K; (2) un anticuerpo de detección específico que se una a la forma activada de un RTK o una proteína cadena abajo (por ejemplo, una proteína adaptadora, efectora o proteína quinasa) y (3) un anticuerpo de detección que reconozca la forma activada de otro RTK o proteína cadena abajo. Los ejemplos no limitantes de proteínas cadena abajo (por ejemplo, una proteína adaptadora, efectora o proteína quinasa) incluyen CK, Shc, AKT, CRKL, PDK1, MEK, FAK, PTEN, ERK/MAPK, BRAF, KRAS, PRAS40 y p70S6K.

C. Producción de anticuerpos

La generación y selección de anticuerpos aún no disponibles en el comercio para analizar los niveles de expresión y/o activación de las moléculas de transducción de señal (por ejemplo, componentes de la ruta de señalización de HER2 y PI3K) en células, tal como en células tumorales, puede realizarse de diversas maneras. Una manera, por ejemplo, es expresar y/o purificar un polipéptido de interés (es decir, un antígeno) usando métodos de expresión y de purificación de proteínas conocidos en la materia, aunque otra manera sería sintetizar el polipéptido de interés usando métodos de síntesis peptídica en fase sólida, conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol., Vol. 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields, ed., Meth. Enzymol., Vol. 289 (1997); Kiso *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 38: 1192-99 (1990); Mostafavi *et al.*, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids, 1: 255-60, (1995); y Fujiwara *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 44: 1326-31 (1996). El polipéptido purificado o sintetizado puede después inyectarse, por ejemplo, a ratones o conejos, para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Un experto en la técnica reconocerá que se dispone de muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies*, A Laboratory Manual, Harlow y Lane, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1988). Por ejemplo, para producir anticuerpos, pueden usarse antígenos PI3K tales como los de las SEC ID N°: 10-12. Un experto en la técnica también apreciará que también pueden prepararse fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan (por ejemplo, conservan las regiones de unión funcional de) anticuerpos, a partir de información genética mediante diversos procedimientos. Véase, por ejemplo, *Antibody Engineering: A Practical Approach*, Borrebaeck, Ed., Oxford University Press, Oxford (1995); y Huse *et al.*, J. Immunol., 149: 3914-3920 (1992).

Además, numerosas publicaciones han indicado el uso de la tecnología de presentación de fagos para producir y explorar bibliotecas de polipéptidos para la unión a un antígeno diana seleccionado (véase, por ejemplo, Cwirla *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378-6382 (1990); Devlin *et al.*, Science, 249: 404-406 (1990); Scott *et al.*, Science, 249: 386-388 (1990); y Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos Nº 5.571.698). Un concepto básico de los métodos de presentación de fagos es el establecimiento de una asociación física entre un polipéptido codificado por el ADN del fago y un antígeno diana. Esta asociación física la proporciona la partícula de fago, que presenta un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite explorar en masa, de manera simultánea, inmensas cantidades de fagos portadores de diferentes polipéptidos. El fago presenta un polipéptido con afinidad por un antígeno diana que se une al antígeno diana y estos fagos se enriquecen por exploración de afinidad con el antígeno diana. La identidad de los polipéptidos presentados por estos fagos puede determinarse por sus genomas respectivos. Usando estos métodos, un polipéptido identificado como que tiene una afinidad de unión por un antígeno diana deseado, puede después sintetizarse en cantidades mediante medios convencionales (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 6.057.098).

Los anticuerpos generados mediante estos métodos pueden después seleccionarse explorando primero la afinidad y especificidad con el antígeno polipeptídico de interés purificado y, si se requiere, comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con otros antígenos polipeptídicos que se desean excluir de la unión. El procedimiento de exploración puede implicar la inmovilización de antígenos polipeptídicos purificados en pocillos distintos de placas de microtitulación. La solución que contiene un posible anticuerpo o un grupo de anticuerpos, se coloca después en los pocillos de microtitulación respectivos y se incuban durante aproximadamente 30 minutos a 2 horas. Después, los pocillos de microtitulación se lavan y a los pocillos se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina, si los anticuerpos creados son anticuerpos de ratón) y se incuban durante aproximadamente 30 minutos y después se lavan. El sustrato se añade a los pocillos y, cuando el anticuerpo está presente en el antígeno polipeptídico inmovilizado, aparecerá una reacción de color.

Después, puede analizarse la afinidad y especificidad de los anticuerpos identificados de este modo. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como un patrón con el cual se evalúa la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se han seleccionado. Dado que la afinidad de unión de diversos anticuerpos puede variar, por ejemplo, determinadas concentraciones de anticuerpos pueden interferir con las de otras desde el punto de vista del efecto estérico, el rendimiento del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad y especificidad absolutas de ese anticuerpo.

Los expertos en la técnica reconocerán que, para producir anticuerpos o fragmentos de unión y para la exploración y selección de afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos de interés, pueden llevarse a cabo muchas estrategias.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se suscitan preferentemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido de interés y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el polipéptido de interés con una proteína transportadora que sea inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, tal como, por ejemplo, hemocianina de lapa americana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, inhibidor de tripsina de semilla de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante. Como ejemplos no limitantes de agentes bifuncionales o derivatizantes se incluyen ester de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (conjugación a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 y $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R_1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el polipéptido de interés o contra un conjugado inmunogénico o un derivado de los mismos, combinando, por ejemplo, 100 μg (para conejos) o 5 μg (para ratones) del antígeno o conjugado con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo con aproximadamente 1/5 o 1/10 la cantidad original del polipéptido o conjugado en adyuvante incompleto de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Después de siete a catorce días, se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo con respecto a la titulación del anticuerpo. Generalmente los animales reciben un refuerzo hasta el nivel de titulación. Preferentemente, el animal recibe un refuerzo con el conjugado del mismo polipéptido, pero también puede usarse la conjugación con una proteína inmunogénica diferente y/o a través de un reactivo de entrecruzamiento diferente. También pueden prepararse conjugados en cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. En determinados casos, pueden usarse agentes agregantes, tales como alumbre, para potenciar la respuesta inmunitaria.

2. Anticuerpos monoclonales

Generalmente, los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pudiesen estar presentes en cantidades minoritarias. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos distintos. Por ejemplo,

pueden fabricarse anticuerpos monoclonales usando el método de hibridoma descrito por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975) o mediante cualquier método de ADN recombinante conocido en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567).

5 En el método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado (por ejemplo, un hámster) se inmuniza, como se describe anteriormente, para suscitar linfocitos que produzcan, o sean capaces de producir, anticuerpos que se unan específicamente al polipéptido de interés utilizado para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se inmunizan *in vitro*. Los linfocitos inmunizados se fusionan después con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar células de hibridoma (véase, por ejemplo Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, págs. 59-103 (1986)). Las células de hibridoma preparadas de este modo se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), el medio de cultivo para las células de hibridoma generalmente incluirán hipoxantina, aminopterina, y timidina (medio HAT), que impide el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas son las que se fusionan eficazmente, mantienen la producción, a altos niveles estables, de anticuerpos, mediante las células productoras de anticuerpos seleccionadas y/o son sensibles a un medio, tal como, medio HAT. Los ejemplos de dichas líneas de células de mieloma preferidas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos incluyen, pero sin limitación, líneas de mieloma murino, tales como las procedentes de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 (disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center; San Diego, CA), células SP-2 o X63-Ag8-653 (disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo; Rockville, MD) y líneas de células de heteromieloma de ratón-humano o de mieloma humano (véase, por ejemplo, Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, págs. 51-63 (1987)).

El medio de cultivo en el que se desarrollan las células de hibridoma puede ensayarse con respecto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de interés. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales puede determinarse usando, por ejemplo, el análisis Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante métodos convencionales (véase, por ejemplo Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, págs. 59-103 (1986)). Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, del fluido ascítico o del suero, mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que, de otra manera, no producen anticuerpos, para inducir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Véase, por ejemplo, Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol., 5: 256-262 (1993); y Pluckthun, Immunol Rev., 130: 151-188 (1992). El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)), o uniendo mediante enlace covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina, toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina.

Pueden aislarse anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo de bibliotecas de anticuerpos en fagos generadas utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty *et al.* Nature 348:552-554 (1990); Clackson *et al.* Nature 352:624-628 (1991) y Marks *et al.* J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991). En Marks *et al.* BioTechnology 10:779-783 (1992) se describe la producción de anticuerpos monoclonales humanos de alta afinidad (intervalo de nM) por barajado de cadenas. El uso de infección combinatoria y recombinación *in vivo*, como estrategia para la construcción de fagotecas muy grandes, se describe en Waterhouse *et al.* Nucleic. Acids Res. 21:2265-2266 (1993). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para la generación de anticuerpos monoclonales.

3. Anticuerpos humanizados

En la técnica se conocen métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Preferentemente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos "importados", que generalmente se extraen de un dominio variable "importado". La inmunización puede realizarse esencialmente sustituyendo las secuencias de la región hipervariable de un anticuerpo no humano por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Véase, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); y Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988). Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la región hipervariable y posiblemente algunos restos de la región marco (FR, por *Framework Region*) se sustituyen por restos de sitios análogos en los anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, a usar en la fabricación de anticuerpos humanizados descritos en el presente documento es un aspecto importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el método denominado "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se explora frente a toda la biblioteca de secuencias conocidas de dominio variable humano. La secuencia humana que es más próxima a la del roedor se acepta después como la FR humana para el anticuerpo humanizado (véase, por ejemplo, Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); y Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método usa una FR particular procedente de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligera o pesada. La misma FR puede usarse para diferentes anticuerpos humanizados (véase, por ejemplo Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); y Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

También es importante que los anticuerpos humanizados conserven una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos humanizados pueden prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y de los diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Normalmente se dispone de modelos de inmunoglobulina tridimensionales y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y presentan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite realizar análisis del posible papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, los análisis de restos que ejercen influencia sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse con su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse y combinarse restos FR del receptor a partir de secuencias receptoras e importadas de tal manera que se obtengan las características del anticuerpo deseadas, tales como afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directa y específicamente implicados en la influencia sobre la unión antigénica.

Se contemplan diversas formas de anticuerpos humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo de IgA, IgG o IgM intacto.

4. Anticuerpos humanos

Como una alternativa a la humanización, pueden generarse anticuerpos humanos. Pueden producirse animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que pueden, después de la inmunización, producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigota del gen de la región de unión de cadena pesada (JH, *heavy-chain joining*) del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal, produce inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos después de la exposición antigénica. Véase, por ejemplo Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immun.*, 7: 33 (1993); y las patentes de Estados Unidos N° 5.591.669, 5.589.369 y 5.545.807.

Como alternativa puede usarse tecnología de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, usando repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de dominio V del anticuerpo se clonan en fase en un gen de proteína de recubrimiento principal o minoritaria de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y presentarse como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Dado que las partículas filamentosas contienen una copia de ADN monocatenario en el genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen selección de genes que codifican el anticuerpo que presenta estas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La presentación de fagos puede realizarse en una diversidad de

formatos como se describe, por ejemplo, en Johnson *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol., 3: 564-571 (1993). Para la presentación de fagos pueden usarse diversas fuentes de segmentos de genes de dominio variable V. Véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991). Puede construirse un repertorio de genes de dominio V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos contra una diversa serie de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo básicamente las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991); Griffith *et al.*, EMBO J., 12: 725-734 (1993); y en las Patentes de Estados Unidos N° 5.565.332 y 5.573.905.

En determinados casos, pueden generarse anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vitro* como se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.567.610 y 5.229.275.

5. Fragmentos de anticuerpo

Para la producción de fragmentos de anticuerpo se han desarrollado diversas técnicas. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtienen mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo Morimoto *et al.*, J. Biochem. Biophys. Meth., 24: 107-117 (1992); y Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente usando células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo pueden aislarse de las bibliotecas de anticuerpos en fagos mencionadas anteriormente. Como alternativa, fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de células de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Carter *et al.*, BioTechnology, 10: 163-167 (1992)). De acuerdo con otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán obvias para los expertos en la técnica. El anticuerpo de elección puede ser un fragmento Fv monocatenario (scFv, *single chain Fv*). Véase, por ejemplo la Publicación PCT N° WO 93/16185; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.571.894 y 5.587.458. El fragmento de anticuerpo también puede ser también un anticuerpo lineal como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpo lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

6. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes del mismo polipéptido de interés. Otros anticuerpos biespecíficos pueden combinar un sitio de unión para el polipéptido de interés dentro de uno o más sitios de unión para uno o más antígenos adicionales. Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En la técnica se conocen métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la expresión conjunta de dos pares de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (véase, por ejemplo Millstein *et al.*, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la disposición aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla posible de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se realiza por cromatografía de afinidad. En la publicación PCT N° WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se desvelan procedimientos similares.

De acuerdo con una estrategia diferente, dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación entre anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la región bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (CH1) conteniendo el sitio necesario para la unión en la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. El ADN que codifica las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se inserta en vectores de expresión distintos, y se transfectan conjuntamente en un organismo hospedador adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos cuando proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en las mismas proporciones da como resultado rendimientos superiores o cuando las proporciones no son de significado particular.

En esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos pueden estar compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrido (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadena de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO 94/04690 y Suresh *et al.*, Meth. Enzymol., 121: 210 (1986).

De acuerdo con otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos N° 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede modificarse genéticamente para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recupera del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, se reemplaza una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácido de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes sobre la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácido con las más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero sobre otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse con avidina y el otro con biotina. Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. En la técnica se conoce muy bien agentes de entrecruzamiento y técnicas adecuados, y se desvelan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

En la técnica también se conocen técnicas adecuadas para generar anticuerpos biespecíficos de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos usando enlace químico. En algunos casos, los anticuerpos biespecíficos pueden generarse mediante un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂ (véase, por ejemplo, Brennan *et al.*, Science, 229: 81 (1985)). Estos fragmentos se reducen en presencia del agente de formación de complejos de ditiol arsenito sódico para estabilizar ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten después en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Después, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico.

Los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')₂ puede producirse mediante los métodos descritos en Shalaby *et al.*, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992). Cada fragmento Fab' se segrega por separado de *E. coli* y se somete a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecíficos directamente de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Véase, por ejemplo, Kostelny *et al.*, J Immunol., 148: 1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se ligaron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH complementarios del otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión antigénica. En Gruber *et al.*, J. Immunol., 152: 5368 (1994) se describe otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpo biespecíficos utilizando dímeros de Fv monocatenario (sFv).

También se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Véase, por ejemplo, Tutt *et al.*, J. Immunol., 147: 60 (1991).

7. Purificación de anticuerpos

Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos pueden producirse dentro de una célula hospedadora aislada, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce de forma intracelular, como primera etapa, se retiran los desechos particulados, ya sean células hospedadoras o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 20-30 min. Los desechos celulares pueden retirarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran generalmente usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el comercio, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie e isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$, o $\gamma 4$ (véase, por ejemplo, Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (véase, por ejemplo, Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se adhiere el ligando de afinidad es muy frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. También están disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poliácido aspártico), cromatografía en SDS-PAGE, y precipitación en sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo a recuperar.

Tras cualquier etapa o etapas preliminares de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y los contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrófoba de bajo pH usando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5-4,5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones salinas (por ejemplo, sal a aproximadamente 0-0,25 M).

Un experto en la técnica apreciará que cualquier molécula de unión que tenga una función similar a la de un anticuerpo, por ejemplo, una molécula de unión o un compañero de unión que es específico de uno o más analitos de interés en una muestra, también pueden usarse en los métodos y composiciones. Los ejemplos de moléculas adecuadas, similares a anticuerpo, incluyen, pero sin limitación, anticuerpos de dominio, unicuerpos, nanocuerpos, proteínas reactivas de antígeno de tiburón, dímeros, adnectinas, anticalmantes, ligandos de afinidad, filómeros, aptámeros, aficuerpos, trinectinas y similares.

D. Métodos de administración

De acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento, los fármacos contra el cáncer descritos en el presente documento se administran a un sujeto mediante cualquiera de los medios convenientes conocidos en la técnica. Los métodos pueden usarse para determinar, predecir, identificar y/o controlar la respuesta de un tumor (por ejemplo, un tumor de mama primario o metastásico) al tratamiento con uno o más fármacos contra el cáncer. Los métodos también pueden usarse para seleccionar uno o más fármacos adecuados contra el cáncer para el tratamiento de un tumor (por ejemplo, un tumor de mama primario o metastásico) en un sujeto. Un experto en la técnica apreciará que pueden administrarse uno o más fármacos contra el cáncer en solitario o como parte de una estrategia terapéutica combinada con quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y/o cirugía convencional.

El fármaco contra el cáncer comprende un agente antiseñalización (es decir, un fármaco citostático) tal como un anticuerpo monoclonal o un inhibidor de tirosina quinasa; un agente anti proliferativo; un agente quimioterapéutico (es decir, un fármaco citotóxico); un agente terapéutico hormonal; un agente radioterapéutico; una vacuna y/o cualquier otro compuesto con la capacidad de reducir o anular el crecimiento incontrolado de células aberrantes tales como células cancerosas. El sujeto puede tratarse con uno o más agentes antiseñalización, agentes antiproliferativos y/o agentes terapéuticos hormonales en combinación con al menos un agente quimioterapéutico. En el presente documento también se describen ejemplos de anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa, agentes antiproliferativos, agentes quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes radioterapéuticos y vacunas.

El fármaco contra el cáncer puede comprender uno o más compuestos que modulan la actividad HER2 incluyendo anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa y combinaciones de los mismos. Como ejemplos no limitantes de compuestos moduladores de HER2 se incluyen anticuerpos monoclonales tales como trastuzumab (Herceptin®), trastuzumab-DM1, ertumaxomab y pertuzumab (2C4; Omnitarg™); inhibidores de tirosina quinasa de moléculas pequeña tales como gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), pilitinib, CP-654577, CP-724714, canertinib (CI 1033), HKI-272, lapatinib (GW-572016; Tykerb®), PKI-166, AEE788, BMS-599626, HKI-357, BIBW 2992, ARRY-334543, JNJ-26483327, y JNJ-26483327; y combinaciones de los mismos. Pueden usarse compuestos moduladores de HER2 en combinación con uno o más fármacos contra el cáncer distintos, descritos en el presente documento o conocidos por un experto en la técnica.

El fármaco contra el cáncer puede comprender uno o más compuestos que modulan la actividad de HER3 y otros elementos de la familia ErbB que incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores de tirosina quinasa y combinaciones de los mismos. Como ejemplos no limitantes de estos compuestos se incluyen anticuerpos monoclonales tales como MM-121, AMG-888 (U3-1287), trastuzumab (Herceptin®), pertuzumab (2C4; Omnitarg™), cetuximab (Erbix®); inhibidores de tirosina quinasa de moléculas pequeña tales como gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), canertinib (CI 1033), lapatinib (GW-572016; Tykerb®), MP-470, AZD8931, PF00299804; y combinaciones

de los mismos. Los compuestos moduladores de RTK pueden incluir compuestos modulares de HER1, HER2 y HER3, compuestos moduladores de cMET y compuestos moduladores de IGF-1R. Los compuestos moduladores de HER1, HER2 y HER3 pueden usarse en combinación con uno o más fármacos contra el cáncer distintos, descritos en el presente documento o conocidos por un experto en la técnica.

El fármaco contra el cáncer puede comprender uno o más compuestos que modulan la actividad PI3K que incluyen anticuerpos monoclonales, inhibidores y combinaciones de los mismos. Como ejemplos no limitantes de estos compuestos se incluyen inhibidores tales como SF1126 (Semaphore Pharmaceuticals), XL147 (Exelixis), XL765 (Exelixis), NVP-BEZ235 (Novartis), NVP-BGT226 (Novartis), NVP-BKM120 (Novartis), GDC-0941 (Genentech/Piramed Pharma), PX-866 (ProlX Pharmaceuticals), GSK1059615 (GlaxoSmithKline), CAL-101 (Calistoga Pharmaceuticals), y combinaciones de los mismos.

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

Los agentes ejemplares antiproliferativos incluyen inhibidores de mTOR tales como sirolimus (rapamicina), temsirolimus (CCI-779) y everolimus (RAD001); inhibidores de AKT tales como 1L6-hidroxiometil-quiros-inositol-2-(R)-2-O-metil-3-O-octadecil-*sn*-glicerocarbonato, acetato de 9-metoxi-2-metileipticinio, 1,3-dihidro-1-(1-((4-(6-fenil-1H-imidazo[4,5-g] quinoxalin-7-il)fenol)metil)-4-piperidinil)-2H-bencimidazol-2-ona, 10-(4'-(N-dietilamino)butil)-2-clorofenoxacina, 3-formilcromona tiosemicarbazona (complejo Cu(II)Cl₂), API-2, un péptido de 15 unidades monoméricas derivado de 10-24 aminoácidos del protooncogen TCL1 (Hiromura *et al.*, J. Biol. Chem., 279: 53407-53418 (2004), KP372-1 y los compuestos descritos en Kozikowski *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 125: 1144-1145 (2003) y Kau *et al.*, Cancer Cell, 4: 463-476 (2003); y sus combinaciones.

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

Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales incluyen, sin limitación, inhibidores de aromatasa (por ejemplo, aminoglutetimida, anastrozol (Arimidex[®]), letrozol (Femara[®]), vorozol, exemestano (Aromasin[®]), 4-androsteno-3,6,17-triona (6-OXO), 1,4,6-androstatrieno-3,17-diona (ATD), formestano (Lentaron[®]), etc.), moduladores de receptores de estrógeno selectivos (por ejemplo, bazedoxifeno, clomifeno, fulvestrant, lasofoxifeno, raloxifeno, tamoxifeno, toremifeno, etc.), esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasteride y agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) tales como goserelina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus estereoisómeros, sus derivados, sus análogos y sus combinaciones.

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

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

Los fármacos contra el cáncer descritos en el presente documento pueden administrarse conjuntamente con agentes inmunoterapéuticos convencionales que incluyen, sin limitación, inmunoestimulantes (por ejemplo, Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, alfa-interferón, etc.), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de pseudomonas, etc.) y radioinmunoterapia (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD20 con ¹¹¹In, ⁹⁰Y o ¹³¹I, etc.).

Los fármacos contra el cáncer pueden administrarse con un excipiente farmacéutico adecuado según sea necesario y pueden llevarse a cabo mediante cualquiera de los modos de administración aceptados. Por tanto, la administración puede ser, por ejemplo, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intraarticular, intraarteriolar, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intravesical, intratecal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal o por inhalación. La expresión “coadministrar” significa que un fármaco contra el cáncer se administra al mismo tiempo, justo antes que, o justo después de la administración de un segundo fármaco (por ejemplo, otro fármaco contra el cáncer, un fármaco útil para reducir los efectos secundarios asociados con la terapia del fármaco contra el cáncer, un agente radioterapéutico, un agente terapéutico hormonal, un agente inmunoterapéutico, etc.).

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco contra el cáncer puede administrarse con regularidad, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 veces, o más, o la dosis puede administrarse mediante infusión continua. La dosis puede estar en forma sólida, semisólida, en forma de polvo liofilizado, o en forma de dosificación líquida, tal como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas o similares, preferentemente en forma de dosificación unitaria adecuada para una administración sencilla de dosificaciones exactas.

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

Los expertos en la técnica conocen métodos para preparar dichas formas de dosificación (véase, por ejemplo REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación generalmente incluyen un transportador o un excipiente farmacéutico convencional y adicionalmente puede incluir otros agentes medicinales, transportadores, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de filtración tisular, solubilizadores y similares. Los excipientes apropiados pueden ajustarse a la forma de dosificación y a la vía de administración particular mediante métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, citado anteriormente).

Como ejemplos de excipientes adecuados, se incluyen, pero sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y ácidos poliacrílicos tales como Carbopols, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil- y propil-hidroxibenzoatos (es decir, los parabenos); agentes ajustadores de pH, tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes y agentes saporíferos. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas poliméricas biodegradables, dextrano y complejos de inclusión de ciclodextrina.

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

La dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de píldora, comprimido o cápsula y, por tanto, la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco contra el cáncer, cualquiera de lo siguiente: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y similar; un disgregante tal como almidón o sus derivados; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma arábica, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y sus derivados. Un fármaco contra el cáncer también puede formularse en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un transportador de polietilenglicol (PEG).

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

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

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

Un sujeto también puede controlarse a intervalos de tiempo periódicos para evaluar la eficacia de un determinado régimen terapéutico. Por ejemplo, los estados de activación de determinadas moléculas de transducción de señal pueden cambiar basándose en el efecto terapéutico del tratamiento con uno o más de los fármacos contra el cáncer, descritos en el presente documento. El sujeto puede monitorizarse para evaluar respuestas y comprender los efectos de determinados fármacos o tratamientos en una estrategia individualizada. Adicionalmente, los sujetos que inicialmente responden a un fármaco específico contra el cáncer o a una combinación de fármacos contra el cáncer pueden volverse resistentes al fármaco o a la combinación de fármacos, lo que indica que estos sujetos han desarrollado resistencia adquirida al fármaco. Estos sujetos pueden interrumpir su terapia actual y el tratamiento alternativo prescrito de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

En determinados aspectos, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse junto con paneles de marcadores de expresión de genes que predicen la probabilidad de pronóstico y/o de recurrencia de cáncer de mama en diversas poblaciones de mujeres, por ejemplo, con enfermedad ganglionar negativa. Estos paneles de genes pueden ser útiles para identificar mujeres con poca probabilidad de recurrencia y, por tanto, es improbable que se beneficien de la quimioterapia con adyuvante. Los paneles de expresión pueden usarse para identificar mujeres que pueden evitar, sin peligro, la quimioterapia con adyuvante, sin afectar negativamente a los resultados de supervivencia sin enfermedad y supervivencia global. Los sistemas adecuados incluyen, pero sin limitación, Oncotype DX™, que es un panel de 21 genes de Genomic Health, Inc.; MammaPrint®, que es un panel de 70 genes de Agendia; y un panel de 76 genes de Veridex.

Además, en determinados otros aspectos, los métodos descritos en el presente documento pueden usarse junto con paneles de marcadores de expresión de genes que identifican los tumores originales de cánceres de un sitio primario desconocido (CUP, *Cancer of an unknown primary site*). Estos paneles de genes pueden ser útiles en la identificación de mujeres con cáncer metastásico que se beneficiarían de la terapia coherente con la proporcionada a mujeres inicialmente diagnosticadas con cáncer de mama. Los sistemas adecuados incluyen, sin limitación, el ensayo CancerTYPE ID de Avicara, un ensayo de expresión basado en RT-PCR que mide 92 genes para identificar el sitio de origen primario de 39 tipos de tumores; y el Ensayo Pathwork® Tissue of Origin, que mide la expresión de más de 1600 genes en una micromatriz y compara una "firma" de expresión de genes tumorales frente a los de 15 tipos de tejidos conocidos.

VI. Ejemplos

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

Ejemplo 1: análisis cuantitativo de la activación de PI3K para seleccionar en pacientes compuestos moduladores de PI3K.

Este ejemplo demuestra que la presencia del complejo PI3K activado (fosforilado) se correlaciona con la presencia de componentes de la ruta del complejo PI3K activado, incluyendo, pero sin limitación AKT, mTOR y S6K. Este ejemplo ilustra que, en determinados casos, los pacientes con cáncer de mama con niveles elevados de activación de PI3K, también expresan AKT activada (fosforilada). De los 21 pacientes con PI3K activada, 19 también tuvieron niveles elevados de fosfo-AKT. Esto confirma el descubrimiento de que la fosfo-AKT actúa aguas abajo de PI3K y que la activación de PI3K puede dar lugar a la activación de AKT. Este alto grado de correlación (valor $p=0,0222$; FIG. 6) entre la activación de PI3K y AKT fosforilada en muestras de pacientes con cáncer de mama confirman que la activación de la ruta PI3K es biológicamente relevante de tumorigénesis.

Se realizó un análisis de perfilado de ruta de 60 muestras de AAF recogidas de pacientes con cáncer de mama. Se utilizó una plataforma CEER (*Collaborative Enzyme Enhanced Reactive-immunoassay*, inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas) de inmunomatrix multicomplejo para determinar los niveles de expresión y fosforilación de las proteínas de la ruta. Se extrajo ADN de las muestras y se analizaron paneles de mutaciones

somáticas. Las rutas activadas detectadas incluían HER1, HER2, HER3, IGF-1R, cMET, PI3K y proteínas aguas abajo asociadas.

Este ejemplo muestra que solamente 5 de 21 pacientes con activación PI3K, portaban mutaciones PI3KCA. Y que en la mayoría de los pacientes con cáncer de mama, la AKT activada (fosforilada) se corresponde con el estado PI3KCA de tipo silvestre. Aunque existe una correlación entre las mutaciones PI3KCA y la respuesta a inhibidores de PI3K, este ejemplo ilustra que los pacientes con cáncer sin alteración de la ruta PI3K también pueden beneficiarse de la terapia con el inhibidor de PI3K. La FIG. 6 ilustra una comparación de fosfo-AKT y fosfo-PI3K en un análisis de perfilado de ruta de pacientes con cáncer de mama. La FIG. 7 ilustra que la presencia de fosfo-PI3K se correlaciona con fosfo-AKT en 60 muestras de AAF de pacientes con cáncer de mama. AKT activada se detectó en pacientes sin mutaciones PI3KCA. La FIG. 8 ilustra que AKT activada no se correlaciona con mutaciones somáticas PI3KCA.

Ejemplo 2: Análisis cuantitativo de activación de PI3K y de activación de receptores tirosina quinasa (RTK) de la familia ErbB en muestras de AAF de pacientes con cáncer de mama.

Este ejemplo ilustra un análisis de activación de ErbB y la formación de dímeros junto con la activación de la ruta PI3K en pacientes con cáncer de mama. En particular, este ejemplo muestra que un nivel aumentado de ErbB fosforilada activada, tal como HER2 fosforilada y HER3 fosforilada, está asociado con niveles aumentados de p-AKT y p-PI3K. Además, este ejemplo muestra que pacientes con niveles aumentados de activación de ErbB y dimerización pueden beneficiarse de tratamientos con inhibidores de PI3K. Detectando la presencia o ausencia de cualquiera de los cambios en los niveles de HER2, HER3, PI3K y/o AKT activados, puede evaluarse la sensibilidad clínica de los inhibidores de PI3K.

Se realizaron análisis de la ruta en 60 muestras de AAF recogidas de pacientes con cáncer de mama. Se utilizó una CEER (*Collaborative Enzyme Enhanced Reactive-immunoassay*) de inmunomatriz multicomplejo para determinar los niveles de expresión y fosforilación de las proteínas de la ruta. Se extrajo ADN de las muestras y se analizaron paneles de mutaciones somáticas. Las rutas activadas detectadas incluían HER1, HER2, HER3, IGF-1R, cMET, PI3K y proteínas aguas abajo asociadas (por ejemplo, proteínas adaptadoras y efectoras).

Este ejemplo ilustra un alto grado de correlación entre las HER2, HER3, PI3K y AKT activadas en 60 muestras de AAF de pacientes con cáncer de mama. En particular, la fosfo-HER3 se activó en 20 de 21 pacientes que tenían fosfo-PI3K activada ($p=0,00001$, FIG. 9). Este ejemplo también muestra que pacientes con activación ErbB (es decir, niveles aumentados de complejo HER3:PI3K, fosfo-HER3, HER3 total, heterodímero HER2/HER3, heterodímero HER1/HER3, heterodímero HER4/HER3 en presencia de Herregulina (HRG) o $TGF\alpha$) pueden beneficiarse del tratamiento con el inhibidor de PI3K. La FIG. 9 ilustra un alto grado de correlación entre la presencia de fosfo-HER3 y fosfo-PI3K en 60 muestras de AAF de pacientes con cáncer de mama. Independientemente del valor límite para PI3K usado en el ensayo, hay una correlación entre fosfo-HER3 y fosfo-PI3K en las muestras. La FIG. 10 ilustra una correlación entre la presencia de fosfo-HER3 y fosfo-AKT en pacientes con cáncer de mama. La FIG. 11 muestra que PI3K activada está asociada con AKT activada y fosfo-HER3. La FIG. 6 también muestra que AKT activada se correlaciona con fosfo-HER3 en ausencia de activación de PI3K. La FIG. 12 muestra que la fosfo-HER2 está asociada con PI3K activada y AKT activada en muestras de AAF de pacientes con cáncer de mama. La FIG. 13 muestra activación simultánea de fosfo-HER2, fosfo-PI3K y fosfo-AKT en muestras de pacientes con cáncer de mama que no tienen mutaciones o amplificaciones genéticas HER2.

Ejemplo 3: análisis cuantitativo de activación de PI3K y HER3. Activación en pacientes reincidentes con terapia de combinación con herceptina.

En el presente documento se describe un análisis exhaustivo de receptores tirosina quinasa de firma clave que incluyen HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, y proteínas quinasas y adaptadoras aguas abajo que incluyen PI3K, Shc, AKT y ERK, en muestras extraídas con aspirado con aguja fina (AAF) de sitios metastásicos de pacientes con cáncer de mama (BCA, *breast cancer*) que han recaído con terapia contra el cáncer.

En este estudio, se realizó un análisis de perfilado de ruta con CEER-AAF en una biopsia de hígado guiada por ultrasonido endoscópico (USE) de pacientes con cáncer de mama que recayeron con terapia de combinación con Herceptina. Se detectaron niveles elevados de las formas activadas de las proteínas HER1, HER2, HER3, p95, PI3K, AKT, ERK/MAPK, y Shc en la muestra. El perfil de activación de la ruta sugiere que el paciente puede ser clínicamente sensible a un tratamiento de combinación que comprende un inhibidor de pan-HER y un inhibidor de PI3K.

En otro estudio se realizó un análisis de perfilado de la ruta con CEER-AAF en una biopsia del ganglio axilar de un paciente con cáncer de mama que recayó con terapia de combinación con Herceptina. El análisis mutacional somático muestra que el paciente tiene una mutación en PI3KCA, H1047R. Se detectaron niveles elevados de las formas activadas de las proteínas HER1, HER2, HER3, cMET, Shc, ERK/MAPK, PI3K y AKT. El perfil de activación de la ruta sugiere que el paciente puede ser sensible a terapia de combinación con el inhibidor de PI3K.

Este ejemplo también sugiere que los pacientes con activación ErbB (es decir, niveles aumentados del complejo HER3:PI3K, fosfo-HER3, HER3 total, heterodímero HER2/HER3, heterodímero HER1/HER3, heterodímero HER4/HER3, Herregulina (HRG) o TGF α) pueden beneficiarse del tratamiento de combinación. Un paciente con cáncer de tumor sólido que tiene un nivel elevado de complejo HER3/PI3K puede beneficiarse de un régimen de tratamiento que comprende el inhibidor de PI3K y terapia con el anticuerpo anti-HER3. Un paciente con cáncer de tumor sólido que tiene niveles elevados de heterodímero HER2/HER3 puede ser clínicamente sensible a un tratamiento de combinación de inhibidor de PI3K y bien Pertuzamab o un anticuerpo anti-HER2 o un TKI. La FIG. 14 muestra las proteínas HER1, HER2, HER3, p95, ERK, Shc, PI3K, AKT y ERK activadas en una muestra de un paciente con cáncer de mama que recayó con terapia de combinación con Herceptina. La FIG. 15 muestra proteínas activadas HER2, HER3, cMet, ERK, PI3K y AKT en una muestra de un paciente con cáncer de mama con una mutación somática PIK3CA, H1047R que recayó con terapia de combinación con Herceptina.

Ejemplo 4: perfilado de activación de rutas de muestras de tumor expuestas a terapia contra el cáncer.

Este ejemplo demuestra la detección de niveles totales y activados (fosforilados) de rutas RTK y de proteínas quinasas, efectoras y adaptadoras, aguas abajo, en muestras de células tumorales, como se determina mediante una plataforma de ensayo CEER. Se detectaron niveles más altos de PI3K, AKT, ERK fosforiladas (dianas efectoras aguas abajo), así como de HER1, HER2, HER3 e IGF-1R activados (que también se conocen como proteínas reclutadoras de membrana PI3K). Las muestras de células de tumor de carcinoma pulmonar no microcítico pueden exponerse a terapia con inhibidor de AKT y/o inhibidor HER1. Se detectaron niveles elevados de PI3K, AKT, ERK fosforiladas (dianas efectoras aguas abajo), así como de HER1, HER2, HER3 e IGF-1R activadas (que también se conocen como proteínas reclutadoras de membrana PI3K). Las muestras de tumor de cáncer de mama se expusieron a inhibidor de AKT y/o a Lapatinib (un inhibidor de tirosina quinasa). Este ejemplo ilustra que las células cancerosas pueden adaptarse a presión terapéutica debido a terapia farmacológica. También se muestra que la terapia con inhibidor de PI3K en combinación con compuestos moduladores de ErbB (es decir, anticuerpo anti-HER2, tal como Pertuzamab, anticuerpo anti-HER3, e inhibidor de tirosina quinasa) puede beneficiar a pacientes que ya no responden a compuestos moduladores de ErbB en solitario. La FIG. 16 muestra análisis con CEER-AAF de la activación de la ruta PI3K en muestras de células de tumor NSCLC después del tratamiento con un inhibidor de AKT, un inhibidor de HER1 o una terapia de combinación. La FIG. 17 ilustra análisis CEER-AAF de biomarcadores en el perfilado de rutas de muestras de células de cáncer de mama después del tratamiento con un inhibidor de AKT, Lapatinib (un inhibidor de tirosina quinasa) o terapia de combinación.

Ejemplo 5: nuevos ensayos con complejos basados en proximidad para medir la activación y la dimerización de HER.

Este ejemplo ilustra nuevos ensayos de dimerización y formación de complejos basados en proximidad que pueden detectar específicamente acontecimientos de activación en complejos de transducción de señales con sensibilidad a un nivel unicelular. Los ensayos que comprenden una plataforma CEER, son extremadamente útiles para tratar una cantidad limitada de muestra y ventajosamente proporcionan el perfilado de expresión/activación de quinasas y de otras moléculas de la ruta de transducción de señal en células tumorales circulantes recogidas y en muestras tumorales metastásicas obtenidas con AAF.

El nuevo ensayo con dímeros basado en proximidad puede detectar complejos heterodiméricos de ErbB en muestras de tumores de pacientes. También puede detectar estos complejos en células cancerosas expuestas a fármacos contra el cáncer y/o a ligandos de activación de rutas, tales como, pero sin limitación, HRG y EGF.

El nuevo ensayo con complejos basado en proximidad puede detectar complejos HER3/PI3K en muestras tumorales de cáncer pancreático.

Este ejemplo ilustra que tres anticuerpos usados en el ensayo de proximidad pueden comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de un elemento del par del dímero; (2) un primer anticuerpo de detección específico de un primer elemento del par del dímero, en el que el primer anticuerpo de detección es específico de un dominio diferente al del anticuerpo de captura; y (3) un segundo anticuerpo de detección específico de un segundo elemento del par del dímero. El nuevo ensayo con dímeros basado en proximidad puede usarse para detectar y cuantificar la homo o heterodimerización de receptores tirosina quinasa, que incluyen, sin limitación, dímeros HER1/HER2, dímeros HER1/HER3, dímeros HER2/HER3, dímeros HER2/HER2, dímeros HER2/HER4, dímeros p95HER2/HER3, dímeros p95HER2/HER2 y similares.

El ensayo con el complejo de PI3K puede comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de la subunidad p85 de PI3K; (2) un anticuerpo de detección específico que se une a la forma activada de un RTK o una proteína adaptadora; y (3) un anticuerpo de detección que reconoce la forma activada de la subunidad p85 de PI3K. El ensayo con el complejo de PI3K puede comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de la subunidad p85 de PI3K; (2) un anticuerpo de detección específico que se une a la forma activada de un RTK o una proteína adaptadora; y (3) un anticuerpo de detección que reconoce la forma activada de otro RTK o proteína adaptadora. El ensayo con el complejo de PI3K puede comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de la subunidad p110 de PI3K; (2) un anticuerpo de detección específico que se une a la forma activada de un RTK o una proteína

adaptadora; y (3) un anticuerpo de detección que reconoce la forma activada de la subunidad p85 de PI3K. El ensayo con el complejo de PI3K puede comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de la subunidad p85 de PI3K; (2) un anticuerpo de detección específico que se une a la forma activada de un RTK o una proteína adaptadora; y (3) un anticuerpo de detección que reconoce la forma activada de la subunidad p110 de PI3K. El ensayo con el complejo de PI3K puede comprender: (1) un anticuerpo de captura específico de la subunidad p85 de PI3K; (2) un anticuerpo de detección específico que se une a la forma activada de la subunidad p85 de PI3K; y (3) un anticuerpo de detección que reconoce la forma activada de la subunidad p110 de PI3K. La FIG. 18 muestra datos sin procesar de complejos de heterodímeros HER1/2 y HER2/3 en células MCF7 detectados usando un nuevo ensayo con dímeros basado en proximidad. La FIG. 19 muestra la activación de complejos de heterodímeros de HER3 y complejos HER3/PI3K en una muestra de tumor pancreático y en células HDPE. El ensayo con dímeros usando CEER se realizó con 10 µg, 5 µg y 2 µg usando una combinación de anticuerpos de captura y de detección múltiple. Los datos de 5 µg se muestran para todos los complejos, salvo para el complejo HER3/PI3K a 10 µg. Las células HPDE y la muestra tumoral 10-494 forma complejos 1:2 y 2:3, respectivamente. Con respecto a las células HPDE, la muestra tumoral tenía niveles más altos de fosfo-HER3 y asocia con PI3K para formar un complejo HER3/PI3K. La FIG. 20 muestra la activación de heterodímeros de HER2 y PI3K en respuesta a HRG o EGF en células MCF7 (una línea celular de adenocarcinoma de cáncer de mama humano).

Ejemplo 6: detección de la activación de la ruta RTK y PI3K en AAF de pacientes con cáncer de mama.

Este ejemplo ilustra análisis de rutas con CEER-AAF de 59 pacientes con cáncer de mama. Se evaluó la frecuencia de la activación de la ruta RTK, así como de proteínas efectoras y adaptadoras aguas abajo, como se mide mediante el ensayo con CEER, en un grupo de pacientes con tumores sólidos de cáncer de mama. En diversas muestras se detectaron altos niveles de HER2, HER3, PI3K y AKT fosforiladas. Este ejemplo ilustra que la terapia con el inhibidor de PI3K en combinación con compuestos moduladores de ErbB (es decir, anticuerpo anti-HER2, tales como Pertuzamab, anticuerpo anti-HER3 e inhibidor de tirosina quinasa) puede beneficiar a pacientes con este perfil de ruta. El análisis de la ruta con CEER-AAF de pacientes con tumor sólido proporciona información clínica valiosa para ayudar a los médicos a valorar las opciones de tratamiento de la enfermedad para cada paciente según el perfil de activación de la ruta. La FIG. 21 ilustra análisis de la ruta con CEER-AAF de pacientes con cáncer de mama. La FIG. 22 ilustra análisis de la ruta con CEER-AAF de más pacientes con cáncer de mama. La FIG. 23 ilustra análisis de la ruta con CEER-AAF de aún más pacientes con cáncer de mama. La FIG. 24 ilustra análisis de la ruta con CEER-AAF de pacientes con cáncer de mama.

Ejemplo 7: análisis cuantitativo de la activación de PI3K e IGF-1R en pacientes con cáncer de mama.

Este ejemplo ilustra un análisis exhaustivo de receptores tirosina quinasa de firma clave que incluyen HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF1R, y de quinasas aguas abajo y proteínas adaptadoras que incluyen PI3K, Shc, AKT y ERK, en muestras de AAF recogidas de un paciente con cáncer de mama que ha recaído con terapia hormonal. Se detectaron niveles elevados de las proteínas IGF-1R, PI3K AKT y ERK/MAPK activadas. Cabe destacar, que la activación de PI3K en el paciente no se debía a la mutación de PI3KCA. Sorprendentemente, las rutas compensatorias activadas con terapia existente (por ejemplo, con hormonoterapia) asociadas con la ruta hormonal se suspendieron por la terapia, pero no directamente dirigida por la misma. El perfil de activación de la ruta sugiere que el paciente puede beneficiarse clínicamente de un tratamiento de combinación que comprende un inhibidor de IGF-1R y un inhibidor de PI3K. El perfil de la ruta también sugiere que el agente terapéutico que se dirige a la ruta de IGF-1R puede ser eficaz en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama positivos a RE. La FIG. 25 ilustra la activación de IGF-1R, PI3K, AKT y ERK en un paciente con cáncer de mama. La FIG. 26 ilustra la activación de IGF-1R y AKT en un paciente con cáncer de mama. Los niveles de IGF-1R activados se correlacionan con los niveles de fosfo-AKT. Además, los niveles elevados de IGF-1R total se correlacionan con fosfo-AKT.

Ejemplo 8: análisis cuantitativo de la activación de PI3K junto con la activación de IGF-1R o cMet en pacientes con carcinoma pulmonar no microcítico.

Este ejemplo ilustra un análisis exhaustivo de receptores tirosina quinasa de firma clave que incluyen HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, y de quinasas aguas abajo y proteínas adaptadoras que incluyen PI3K, Shc, AKT y ERK, en muestras de pacientes con NSCLC (con carcinoma pulmonar no microcítico) recogidas con AAF, antes de tratamiento contra el cáncer. El método presente puede permitir la detección y medición de los niveles de expresión de una pluralidad de proteínas oncogénicas (por ejemplo, FGFR1, FGFR2, IGF-1R, cMET, HER1, HER2, HER3, VEGFR2, PI3K, SHC, FAK, CRKL) así como los niveles de expresión de sus formas activadas (por ejemplo, fosforiladas) en una muestra biológica de tejido tumoral extraída de un paciente. En algunos casos, las muestras tumorales de pacientes con NSCLC tienen una mutación en KRAS (por ejemplo, G12C, G12D, G12R, G12S, G12V, G13C y G13R).

El método descrito en el presente documento se usó para realizar el perfilado de activación de PI3K de muestras tumorales de pacientes con cáncer de pulmón. Se detectaron niveles elevados de activación de PI3K y AKT junto con la formación de complejos HER1/2, HER1/3, HER2/3 y HER3/PI3K. De manera interesante, también se observó la activación de ERK. La FIG. 27 ilustra la activación de PI3K junto con la activación de IGF-1R o cMET en pacientes con NSCLC. La muestra tumoral del paciente 1 con la mutación en KRAS, G12C, tenía niveles altos de IGF-1R total

y fosforilada junto con altos niveles de complejo PI3K y fosfo-PI3K. El análisis de perfilado de la ruta también muestra que la muestra tumoral del paciente 2 también expresa altos niveles de IGF-1R total y fosforilado, complejo PI3K y fosfo-PI3K. La FIG. 28 ilustra que, en un paciente con cáncer de pulmón, se detectó activación de PI3K junto con activación de HER3 y/o cMET. La FIG. 29 ilustra la activación simultánea de HER3, cMET y PI3K en un paciente con NSCLC con una mutación en KRAS, G12C. Se detectaron otras proteínas efectoras aguas abajo activadas (por ejemplo FAK y CRKL). La expresión de VEGFR2 fue alta y tanto FGFR1 como FGFR2 estaban activados en la muestra. El perfilado de análisis de la ruta se realizó en la muestra tumoral antes del tratamiento. La FIG. 30 muestra un "mapa de calor" de activación de PI3K y de heterodímeros de HER en pacientes con NSCLC. En las muestras tumorales se detectó dimerización de ErbB y activación de la ruta de PI3K. La FIG. 31 ilustra la activación simultánea de HER3 y PI3K en una muestra tumoral sin mutaciones somáticas en KRAS y EGFR de un paciente con NSCLC. También se detectaron niveles de CRKL, FAK y Shc activadas. La expresión total de VEGFR2 también era alta.

Ejemplo 9. Cuantificación de la activación de receptores tirosina quinasa de la familia ErbB y activación de PI3K en pacientes con cáncer gástrico.

Este ejemplo ilustra un análisis exhaustivo de receptores tirosina quinasa de firma clave que incluyen HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R, cKIT y proteínas efectoras aguas abajo que incluyen PI3K, Shc, AKT y ERK, en muestras de pacientes con cáncer gástrico extraídas con AAF. En diversas muestras tumorales se detectaron niveles altos de activación de RTK de la familia ErbB y la formación de dímeros. En alguna muestra, los niveles de activación de cMET se correlacionaban con los niveles de fosfo-HER1.

Para evaluar la concordancia o correlación entre biomarcadores predictivos de cáncer de tumor sólido se realizó análisis de agrupamiento de marcadores. Usando escalado multidimensional que es similar al análisis de componentes principales, se determinó que las formas fosforiladas de cMET y HER1 tenían un alto grado de concordancia en las muestras tumorales de pacientes con cáncer gástrico. También existía la concordancia entre HER2 y Shc, así como IGF-1R y PI3K en estas muestras. De manera interesante, HER3 tenía una estrecha relación tanto con HER2 como con PI3K. Esto conforma la idea de que la detección de un complejo PI3K activado que comprende HER2, HER3 y PI3K puede usarse para determinar la patología o el perfil de la ruta de las muestras de tumor gástrico. La FIG. 32 ilustra la presencia de fosfo-HER3 en muestras de pacientes con cáncer gástrico. En algunas muestras, HER3 activada se correlaciona con la presencia de cMET activada. Se detectaron receptores de ErbB activados en diversas muestras de tumor gástrico. La FIG. 33 muestra un gráfico de Escalado Multidimensional (EMD) que presenta la concordancia de los marcadores de ruta fosforilados. La FIG. 34 ilustra una comparación de PI3K de fosfo-PI3K y fosfo-AKT/ERK en análisis de perfilado de ruta de pacientes con cáncer gástrico. En algunas de las muestras se detectó activación de la familia FGFR que incluye FGFR1, FGFR2, FGFR3 y FGFR4.

Ejemplo 10. Detección de la activación de la ruta PI3K de muestras de tumor sólido de pacientes con cáncer colorrectal antes de terapia.

Este ejemplo ilustra un análisis exhaustivo de receptores tirosina quinasa de firma clave que incluyen HER1, HER2, HER3, cMET, IGF-1R, cKIT y proteínas efectoras aguas abajo que incluyen PI3K, Shc, AKT y ERK, en muestras de pacientes con cáncer colorrectal extraídas con AAF. La muestra tumoral puede tener una mutación del gen KRAS, G13D. La muestra tumoral puede expresar el gen de KRAS de tipo silvestre. La FIG. 35 ilustra la activación de la ruta de PI3K y la activación de la ruta de HER en un paciente con cáncer colorrectal antes de la terapia. La FIG. 36 ilustra la activación de la ruta de PI3K y la activación de la ruta de HER en una muestra con una mutación del gen KRAS, G13D extraída de un paciente con cáncer colorrectal antes de la terapia. La FIG. 36 muestra que las proteínas HER1 (EGFR), HER2, Shc, ERK y AKT estaban muy activadas. La FIG. 37 ilustra la activación de la ruta de PI3K y la activación de la ruta de HER en un paciente con cáncer colorrectal con una mutación del gen KRAS, G12D, antes de la terapia. La FIG. 38 ilustra análisis AAF de biomarcadores en perfilado de ruta de muestras de pacientes con cáncer colorrectal.

Ejemplo 11. Método de detección de la activación de la ruta de PI3K de tumores sólidos de pacientes con cáncer pancreático.

El análisis de expresión solo de proteínas o mutaciones diana tiene limitaciones para seleccionar el régimen de terapia correcto con una eficacia clínica máxima. Un análisis funcional exhaustivo de las proteínas de la ruta, incluyendo su nivel de expresión y fosforilación, es crítico en el desarrollo de estrategias clínicas centradas en la combinación más eficaz de fármacos dirigidos. Se realizó un análisis de perfilado de ruta en receptores tirosina quinasa clave que incluían HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, y proteínas efectoras aguas abajo que incluían PI3K, Shc, AKT y ERK, en muestras de AAF extraídas de pacientes con cáncer pancreático. Sorprendentemente, la activación simultánea de PI3K así como de HER3, IGF-1R y/o cMET en las muestras de pacientes. En esta cohorte se encontraron mutaciones en PIK3CA y en KRAS (por ejemplo, G12V o G12D). La FIG. 39 ilustra análisis AAF de biomarcadores en el perfilado de ruta de pacientes con cáncer pancreático con mutaciones en el gen KRAS. La FIG. 40 ilustra análisis AAF de biomarcadores en el perfilado de ruta de pacientes con cáncer pancreático con y sin mutaciones en KRAS.

Ejemplo 12. Perfilado de enfermedad exhaustivo de pacientes con cáncer de mama usando análisis combinado de proteína funcional y ácido nucleico.

Este ejemplo ilustra un método de perfilado de enfermedad exhaustivo usando una combinación de análisis de proteína funcional y ácido nucleico. La FIG. 41 muestra un esquema de un método ejemplar. El método puede usarse tan solo con aproximadamente 100 células obtenidas de un paciente (610). La muestra puede ser de un aspirado con aguja fina (AAF), de células tumorales circulantes (CTC), de ascitis, de una biopsia guiada por ultrasonido endoscópico, o de otras células extraídas de un paciente. La muestra extraída del paciente representa la fuente de una sola muestra (620) y puede almacenarse y expedirse mediante métodos descritos en la Publicación de Patente Internacional N° WO2011/008149. Una parte alícuota de la muestra puede analizarse usando métodos para determinar el perfil de la ruta funcional en una plataforma automatizada (630), tal como la plataforma CEER (635). Otra parte alícuota de la muestra puede analizarse usando métodos para determinar la presencia de mutaciones somáticas poco comunes (640). Como ejemplos no limitantes de métodos para detectar mutaciones somáticas se incluyen la cuantificación de variantes alélicas y genotipado de SNP (645). Los métodos pueden integrar datos obtenidos del perfilado de rutas funcionales y análisis de mutación somática para proporcionar un perfilado de enfermedad exhaustivo (650). El perfilado de la enfermedad puede presentarse como un informe.

El ejemplo describe resultados de un estudio multicéntrico y multinacional del análisis combinado del perfilado de ruta y mutación somática con CEER-AAF de pacientes con cáncer de mama. Los detalles del estudio se muestran en las FIG. 42 y 43. Los tejidos de los pacientes se exploraron con respecto a la sobreexpresión de HER2 mediante inmunohistoquímica (IHC) primaria y/o hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH *Fluorescent In Situ Hybridization*). En este estudio participaron pacientes con enfermedad reincidente y con diagnóstico de cáncer de mama de estadio IIIB o IV (124 pacientes). Se extrajeron muestras de AAF de diversos sitios metastásicos y/o múltiples de cada paciente. Como ejemplos no limitantes de sitios metastásicos se incluye, hígado, hueso, ganglios linfáticos axilares u otros, pulmón, piel, pared torácica, cerebro y masa esternal. El AAF puede recogerse en un ProteinLater de 100 µl (Prometheus Laboratories; San Diego, CA) con una aguja de calibre 23, y conservarse y expedirse a temperatura ambiente. La muestra de AAF del paciente puede recogerse en un ProteinLater de 100 µl mediante biopsia guiada por ultrasonido endoscópico (USE) y conservarse y expedirse a temperatura ambiente.

Este ejemplo ilustra el análisis intermedio realizado en 58 pacientes para proteínas de rutas múltiples tales como, HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, CK, SHC, AKT, ERK y PI3K, y mutaciones somáticas en genes tales como PIK3CA, KRAS y BRAF. El ensayo CEER puede usarse para detectar niveles de proteína total y/o de proteína activada (fosforilada) de rutas de señalización (por ejemplo rutas RTK y PI3K). Se obtuvo el perfilado de los RTK y de las proteínas de señalización aguas abajo para el 100 % (58 de 58 pacientes) de los lisados AAF ensayados. Este porcentaje es mucho más elevado que la tasa de éxito de ~70 % obtenido en el análisis basado en ARN. De 4 a 8 µl de aproximadamente 100 µl del lisado de AAF puede ser suficiente para realizar el análisis de perfilado de ruta. Las proteínas en el lisado de AAF se preservan bien para el perfilado de la ruta tanto funcional como la exploración del genotipado. En particular, en las proteínas los sitios fosforilados se mantienen. Por tanto, puede usarse una fuente de una sola muestra tanto para la mutación como para el perfilado de ruta para establecer un perfilado de enfermedad exhaustivo.

El perfilado de ruta puede realizarse en aspirado de cáncer de mama de un paciente que recibe agentes terapéuticos contra el cáncer. La FIG. 44 ilustra el uso del perfilado de la ruta PI3K de aspirado de cáncer de mama de una muestra expuesta a inhibidor de HER1.

Los métodos pueden incluir determinar y comparar una ruta de señalización y perfiles de mutación somática de un tumor primario y de un tumor secundario de un paciente de una cantidad mínima de muestra. La FIG. 45 ilustra perfiles de la ruta de PI3K activados (fosforilados) de AAF de un tumor de mama y de AAF de un tumor de ganglio linfático. Usando una aguja de calibre 23 o 25 se obtuvieron muestras de AAF de cualquiera de, ganglio linfático o región axilar. En otros casos, las muestras se obtuvieron por USE-AAF. La FIG. 46A ilustra el nivel de expresión de proteínas de componentes de la ruta PI3K determinado mediante ensayo CEER. La FIG. 46B muestra que los niveles de las proteínas HER1, HER2, HER3, cMET, IGF 1 R y CK son similares en tumor de mama y en tumor de ganglio linfático de los pacientes.

Los métodos pueden usarse para analizar perfiles de ruta de señalización en una cohorte de pacientes y establecer una correlación entre una pluralidad de biomarcadores y perfiles de enfermedad. En algunos casos, puede realizarse un perfilado de enfermedad exhaustivo de un paciente con cáncer de mama para determinar si el paciente se beneficiaría de un tratamiento que comprende un inhibidor de PI3K. La FIG. 47 muestra que en una cohorte de pacientes con cáncer de mama en el estudio hay correlaciones estadísticamente significativas entre las proteínas de la ruta PI3K activadas, mutaciones PI3K activadas y combinaciones de las mismas. La FIG. 48 ilustra los datos obtenidos de un perfilado de enfermedad exhaustivo del paciente 14003-3004 en el análisis intermedio del estudio. Usando los métodos descritos en el presente documento se determinó que el paciente sobreexpresaba HER2 y que tenía un tumor de cáncer de mama con alta actividad de HER3 y PI3K. El perfilado de enfermedad indica que el paciente puede beneficiarse de terapia con el inhibidor de PI3K.

Los métodos pueden usarse para comparar el perfil de ruta de un tumor y de un tejido adyacente normal (TAN). La FIG. 49A muestra una imagen inmunohistoquímica de tejido teñido con un anticuerpo anti-pan CK. Las células tumorales son positivas para CK, mientras que el tejido adyacente normal no expresa CK. La FIG. 49B ilustra los perfiles de la ruta PI3K de muestras de tumor de cáncer de mama y de muestras de tejido adyacente normal. La FIG. 49C muestra resultados de ensayos CEER-AAF descritos en el presente documento. El gráfico muestra que el perfil de ruta de muestras tumorales es diferente si se compara con el tejido adyacente normal. En particular, HER2, HER3, IGF-1R y CK están sobreexpresados en tumores en comparación con tejido adyacente normal.

Los métodos pueden usarse para demostrar que en una muestra AAF de cáncer de mama la frecuencia de la proteína HER2, medida por inmunohistoquímica (IHC), se correlaciona con los niveles aumentados de proteína p95HER2 total y proteína fosfo-p95HER2 determinado por ensayo CEER. La FIG. 50A muestra una transferencia de Western para la proteína HER2 y la proteína p95HER2 en muestras de aspirado de cáncer de mama. La FIG. 50B demuestra que las muestras tumorales que expresan niveles elevados de HER2 (por ejemplo, 3+), medidos por IHC, sobreexpresan más probablemente proteína p95HER2 total y proteína p95HER2 activada (fosforilada) en comparación con las muestras que expresan niveles de 2+ o 1+/0 de HER2. La FIG. 50C representa un gráfico de expresión de la proteína p95HER2 total agrupado por expresión de HER2 medida por IHC.

El análisis intermedio de este estudio también muestra una alta concordancia (100 %) para muestras de HER2 IHC (por ejemplo, 3+) con CEER. La FIG. 51 muestra que 6 muestras de AAF que dieron positivo en el ensayo para HER2 por CEER eran de pacientes que expresaban células positivas a HER2 determinado por IHC primaria. También hubo una concordancia del 90,5 % para tumores negativos a HER2 IHC con CEER. Cabe destacar, que 8 muestras de pacientes tenían mutaciones somáticas en PI3KCA.

Los métodos pueden usarse para determinar un perfil de enfermedad exhaustivo para pacientes con cáncer de mama. La FIG. 52 ilustra datos de análisis de la ruta exhaustivos descritos en el presente documento usando una combinación de perfilado de ruta funcional y genotipado. Para detectar componentes de la ruta de señalización totales y activados (es decir fosforilados) (por ejemplo, HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, CK, PI3K, SHC, AKT y/o ERK), y para detectar mutaciones somáticas en genes, tales como PIK3CA, KRAS y/o BRAF, se analizaron muestras de AAF por ensayo CEER.

Ejemplo 13. Detección de expresión y fosforilación de HER2 en muestras CTC de cáncer de mama mediante CEER.

Este ejemplo ilustra el uso de los métodos para monitorizar y cuantificar los niveles de proteína HER2 total y/o activada en una plataforma de inmunomicromatriz multicomplejo, tal como la plataforma CEER.

Las tasas de supervivencia de cánceres de mama metastásicos son considerablemente bajas. Las células tumorales en el sitio primario a menudo no reflejan el perfil de la población de las células tumorales en la enfermedad recurrente. La evaluación de las células tumorales circulantes (CTC) en la sangre periférica de pacientes ofrece un método no invasivo de monitorización de la enfermedad. La identificación y evaluación de marcadores moleculares fiables en las CTC de pacientes con enfermedad recurrente puede mejorar adicionalmente la supervivencia del cáncer de mama.

La tecnología de inmunoensayo colaborativo reactivo potenciado por enzimas (CEER, por las siglas *Collaborative Enzyme Enhanced Reactive-immunoassay*) utiliza la formación de un inmunocomplejo único que requiere la localización conjunta de dos anticuerpos detectores en proximidad para capturar anticuerpos inmovilizados en una inmunomatriz. La colaboración entre dos enzimas canalizadoras conjugadas en dos anticuerpos de detección en proximidad, permite realizar el perfilado de las proteínas diana con extrema sensibilidad y especificidad.

En este estudio se utilizó CEER para analizar los niveles de proteína HER2 activada y/o total en CTC aisladas de 76 pacientes con cáncer de mama en los estadios III a IV con enfermedad primaria negativa a HER2. Aproximadamente, el 25 % de los pacientes con BCA, negativos a HER2, en esta cohorte, mostró diversos niveles de activación (fosforilación) de HER2 en CTC aisladas de la enfermedad recurrente. Aproximadamente el 8 % de los pacientes, a los que se determinó que tenían activación de HER2, también mostraron sobreexpresión significativa de proteína HER2 total.

Los resultados muestran que la activación de HER2 tiene lugar en presencia o en ausencia de sobreexpresión de HER2. En algunos casos, la activación de HER2 puede producirse a partir de la formación de cualquiera de los heterodímeros de HER2 (por ejemplo, p95HER2/HER2, HER1/HER2, HER2/HER3, HER2/HER4, etc.) y por tanto, los niveles de las proteínas HER2 total no son elevados. En otros casos, la activación de HER2 puede producirse a partir de la sobreexpresión de HER2 y de la formación de homodímeros de HER2 (por ejemplo, HER2/HER2). Los resultados muestran que los niveles de detección de la proteína HER2 activada y total, proporciona un método de control de la enfermedad mejorado en pacientes con cáncer de mama con enfermedad recurrente.

Dado que los perfiles de HER2 pueden variar entre un tumor primario y una enfermedad recurrente en un paciente, hay una necesidad urgente de disponer de un control habitual del estado de HER2 en CTC en pacientes con cáncer de mama metastásico. Además, el control de incidencias de alteraciones de HER2 en CTC usando CEER también

puede ayudar en la selección de regímenes de tratamiento efectivos para pacientes con BCA con enfermedad reincidente. Además, puede usarse CEER para obtener perfiles de otras proteínas diana susceptibles de modularse por fármacos y conducir el desarrollo de terapias clínicas eficaces.

- 5 Ejemplo 14. Los análisis de activación de ruta y de mutación somática en aspirados con aguja fina pueden identificar fármacos candidatos para el tratamiento efectivo de cáncer de mama.

10 Este ejemplo ilustra un análisis molecular y genético exhaustivo de muestras de aspirado con aguja fina (AAF) extraídas de sitios metastásicos de 58 pacientes con cáncer de mama (BCA). Este ejemplo ilustra el uso de los métodos desvelados en el presente documento, tales como la realización de análisis de ruta con CEER-AAF para evaluar la activación de la ruta de RTK y el perfilado de mutación somática oncogénica. En particular, este ejemplo ilustra que los métodos pueden usarse para desarrollar un perfil de enfermedad de una cantidad limitada de una muestra de un paciente.

15 En este estudio, los análisis de rutas con CEER-AAF incluyen examinar receptores tirosina quinasa clave y sus moléculas de señalización aguas abajo, incluyendo HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF-1R, PI3K, Shc, AKT y ERK, así como obtener el perfil mutacional somático de genes oncogénicos (por ejemplo, PI3KCA, KRAS, BRAF y EGFR). Para determinar los niveles de expresión y activación (fosforilación) de las proteínas de la ruta se utilizó una plataforma CEER de inmunomatriz. Todas las muestras de AAF proporcionaron suficiente material para realizar el
20 análisis combinado de expresión/activación de ruta multicomplejo y análisis de mutación somática.

25 Para las muestras no ocultas, se confirmó que todos los AAF de sitios metastásicos (AAFm) extraídos de tumores primarios positivos a HER2, determinado mediante ICH, eran positivos a HER2 mediante análisis CEER. La sobreexpresión de HER2 se encontró en el 10 % de los AAFm extraídos de pacientes con cáncer de mama con tumores primarios negativos a HER2. En esta cohorte, en el 20 % de las muestras se encontraron mutaciones en PIK3CA. Se encontraron niveles significativamente estadísticos más altos de AKT fosforilado, de ERK así como de HER1, HER2, HER3 e IGF-1R en los AAFm que también portaban mutaciones en PIK3CA. Un número significativo de pacientes con PIK3CA de tipo silvestre también mostraron fuertes firmas de ruta lo que indica la activación de la misma. Los resultados del estudio muestran que la evaluación de biomarcadores en pacientes con cáncer de mama
30 debe incluir análisis tanto de proteínas de ruta como de mutaciones.

Un perfilado de enfermedad exhaustivo puede proporcionar información reveladora sobre la eficacia de agentes específicos sobre sus proteínas diana deseadas. El análisis de ruta multicomplejo también puede proporcionar información valiosa con respecto a posibles mecanismos de resistencia a fármacos. Además, el perfil de activación
35 de ruta y mutacional combinado, descrito en el presente documento, puede ayudar a conducir estrategias terapéuticas en un entorno clínico.

LISTADO DE SECUENCIAS NO OFICIAL

40 <160> NÚMERO DE SEC ID NOS:

<210> SEC ID N° 1

<211> LONGITUD: 724

<212> TIPO: prt

45 <213> ORGANISMO *Homo sapiens*

<223> OTRA INFORMACIÓN: p85a de PI3K

<400> SECUENCIA: 1

MSAEGYQYRALYDYKKEREEDIDLHLGDIITVNGSLVALGFSQGQEARPEEIGWLNQYN
ETTGERGDFPGTYVEYIGRKKISPPTPKPRPPRPLPVAPGSSKTEADVEQQALTLPDLAE
QFAPPDIAPELLIKLVEAIEKKGLECSTLYRTQSSSNLAELRQLLDCDTPSVLDLEMDVH
VLADAFKRYLLDLNPVIPAAYVSEMI SLAPEVQSSEYIQLLKKLIRSPSIPHQYWLTL
QYLLKHFFKLSQTSSKNLLNARVLSEIFSPMLFRFSAASSDNTENLIKVIEILISTEWNE
RQPAPALPPKPPKPTTVANNGMNNMSLQDAEWYWGDISREEVNEKLRTADGTFLVRDA
STKMHGDYTLTLRKGGNNKLIKIFHRDGKYGFSDPLTFSSVVELINHYRNESLAQYNPKL
DVKLLYPVSKYQQDQVVKEDNIEAVGKKLHEYNTQFQEKSSREYDRLYEYTRTSQEIQMK
RTAIEAFNETIKIFEEQCQTQERYKEYIEKFKREGNEKEIQRIMHNYDKLKSRISEIID
SRRRLEEDLKKQAAYREIDKRMNSIKPDLIQLRKTRDQYLMWLTQKGVRRQKKNLNEWLGN
ENTEDQYSLVEDDEDLPHHDEKTNVNGSSNRNKAENLLRGKRDGTFLVRESSKQGCYACS
VVVDGEVKHCVINKTATGYGFAEPYNLYSSSLKELVLHYQHTSLVQHNDLNVTLAYPVYA
50 QQRR

<210> SEC ID N° 2

<211> LONGITUD: 728

<212> TIPO: prt
 <213> ORGANISMO *Homo sapiens*
 <223> OTRA INFORMACIÓN: p85β de PI3K

5 <400> SECUENCIA: 2

MAGPEGFQYRALYPFRERPEDELELLPGDVLVVSRAALQALGVAEGGERCPQSVGWMPGL
 NERTRQRGDFPGTYVEFLGPVALARPGPRPRPLPARPRDGAPEPGLTLPDLPEQFSP
 PDVAPPLLVLKVEAIERTGLDSESHYRPELPAPRTDWSLSDVDQWDTAALADGIKSFLLA
 LPAPLVTPEASAEARRALREAAGPVGPALEPPTLPLHRALTTLRFLQLHLGRVASRAPALG
 PAVRALGATFGPLLLRAPPPPSPPPPGGAPDGSESPDFPALLVEKLLQEHLEEQEVAPP
 ALPPKPPKAKPASTVLANGGSPPSLQDAEWYWGDISREEVNEKLRTDPDGTFLVRDASSK
 IQGEYTLTLRKGGNNKLIKVFHRDGHYGFSEPLTFCSVVDLINHYRHESLAQYNAKLDTR
 LLYPVSKYQQDQIVKEDSVEAVGAQLKVYHQYQDKSREYDQLYEEYTRTSQELQMKRTA
 IEAFNETIKIFEEQQTQEKCSKEYLERFRREGNEKEMQRILLNSERLKSRIAEIHESRT
 KLEQQLRQAASDNREIDKRMNSLKPDLMLQRLKIRDQYLVWLTQKGARQKKINELWLGKNE
 TEDQYALMEDEDDLPHEERTWYVGKINRTQAEEMLSGKRDGTFLIRESSQRCGYACSVV
 VDGDTKHCVIYRTATGFGFAEPYNLYGSLKELVLHYQHASLVQHNDALTVTLAHPVRAPG
 PGPPPAAR

10 <210> SEC ID Nº 3
 <211> LONGITUD: 461
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO *Homo sapiens*
 <223> OTRA INFORMACIÓN: p55γ de PI3K

15 <400> SECUENCIA: 3

MYNTVWSMDRDDADWREVMMPYSTELIFYIEMDPPALPPKPPKPMTSAPVNGMKDSSVSL
 QDAEWYWGDISREEVNDKLRDMPDGTFLVRDASTKMGGDYTLTLRKGGNNKLIKIYHRDG
 KYGFSDDLTFNSVVELINHYHHESLAQYNPKLDVKLMYPVSRYQQDQLVKEDNIDAVGKK
 LQEYHSQYQEKSKKEYDRLYEEYTRTSQEIQMKRTAIEAFNETIKIFEEQCHTQEHSKEY
 IERFRREGNEKEIERIMMNYDKLSRLGEIHDSKMRLEQDLKNQALDNREIDKKMNSIKP
 DLIQLRKIRDQHLVWLNHKGVRQKRLNVWLGKKNEDADENYFINEEDENLPHYDEKTFWFV
 EDINRVQAEDLLYGKPDGAFLIRESSKKGCGYACSVVADGEVKHCVIYSTARGYGFAPYV
 LYSSLKELVLHYQQTSLVQHNDLNLVRLAYPVHAQMPSLCR

20 <210> SEC ID Nº 4
 <211> LONGITUD: 1358
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO *Homo sapiens*
 <223> OTRA INFORMACIÓN: p150 de PI3K

25 <400> SECUENCIA: 4

MGNQLAGIAPSQILSVESYFSDIHDFFEYDKSLGSTRFFKVARAKHREGLVVVKVFAIQDP
 TLPLTSYKQELEELKIRLNSAQNCPLPFQKASEKASEKAAMLFRQYVRDNLVDRISTRPFL
 NNIEKRWIAFQILTAVDQAHKSGVRHGDIKTENVMTSWNWVLLTDFASFKPTYLPEDNP
 ADFNYFFDTSRRRTCXYIAPERFVDGGMFATELEYMRDPSTPLVDLNSNQRTREGELKRAMD
 IFSAGCVIAELFTGVPLFDLSQLLAYRNGHFFPEQVLNKIEDHSIRELVTQMIHREPDK
 RLEAEDYLKQQRGNAPFEIFYTFLQPYMAQFAKETFLSADERILVIRKDLGNIJHNLGCH
 DLPEKAEGERKENGVLVSVITSCLQTLKYCDSKLALELILHLAPRLSVEILLDRITP
 YLLHFSNDSVPRVRAEALRTLTKVLALVKEVPRNDINYPEYILPGIAHLAQDDATIVRL
 AYAENIALLAETALRFLELVQLKNLNMENDPNNEEIDEVTHPNGNYDTLQALHEMVQOK
 VVTLSSDPENIVKQTLMEGITRLCVFFGRQKANDVLLSHMITFLNDKNDWHLRGAFFDS
 IVGVAAYVWGQSSSILKPLLQQLSDAEFVIVKALYALTCMCQLGLLQKPHVYEFASDI
 APFLCHPNLWIRYGAVGFITVVARQISTADVCKLMPYLDPYITQPIIQIERKLVLSSVL
 KEPVSRISFDYALRSKDITSLFRHLHMRQKKRNGSLPDCPPPEDPAIAQLLKLLSQGMT
 EEEEDKLLALKDFMMKSNKAKANIVDQSHLHDSQKGVIDLAAALGITGRQVDLVKTKQEP
 DDKRARKHVQKDSNVNEEWKSMFGSLDPPNMPQALPKGSDQEVITGKPPRSESSAGICV
 PLSTSSQVPEVTTVQNKPVIPVLSSTILPSTYQIRITTCKTELQQLIQKREQCNAERI
 AKQMMENAWESEKPPPPGWRPKGLLVHLHEHKSANRI RVSDHSLFATCSNDGTVKIW
 NSQKMEGKTTTTTSRILTYSRIGGRVKTTLTFCQSHYLAIASDNGAVQLLGIEASKLPKSP
 KIHPLQSRILDQKEDGCVDMHFNHSGAQSVALAYATVNGSLVGDRLRSSNAWTLKHDLK
 SGLITSFAVDIHQCWLIGTSSGTMACWDMRFQLPISCHPSRARIIRLSMHPYQSWV
 IAAVQGNNEVSMWDMETGDRRFTLWASSAPPLSELQSPHVSVHGIYCSPADGNPILLTAG
 SDMKIRFWDLAYPERSYVAGSTSSPSVSYRKIIIEGTEVVQEIQNKQKVGPSDDTPRRG
 PESLPVGHHDIIITDVATFQTTQGFIVTASRDGIVKVK

<210> SEC ID Nº 5
 <211> LONGITUD: 880
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO *Homo sapiens*
 <223> OTRA INFORMACIÓN: p101 de PI3K

<400> SECUENCIA: 5

MQPGATTCTEDRIQHALLERCLHGLSLRRSTSWAGLCLNCWSLQELVSRDPGHFLILLE
 QILQKTRFVQEKGTIDLLTPLALLFYSTVLCTPHFPDSDLLKAASTYHRFLTWPVPC
 SIQELLTFIDAEKAPGISYQRLVRAEQGLPIRSHRSSTVTVLLNPNVEVQAEFLAVAN
 KLSTPGHSPHSAYTTLLHAFQATFGAHCDDVPLHCRLOAKTLAELEDI FTETAEAQELA
 SGIGDAAEARRWLRTKLQAVGEKAGFPGLDGTAKPGKLHTIPIPVARCITYSWSQDSFDI
 LQEIILLKEQELLQPGILGDDEEEEEEEVEEDLETDGHCAERDSSLSTSSLASHDSTLS

LASSQASGPALSRHLLTSFVSGLSDGMDSGYVEDSEESSSEWPWRRGSQERRGHRPQK
 FIRIYKLFKSTSQLVLRDRSRSLGSSDTALPLRRAGSLCSPLDEPVSPPSRAQRSRLP
 QPKLGTQLPSWLLAPASRPQRRRPFSLGDEDPKASTLRVVVFGSDRISGKVARAYSNLRR
 LENNRPLLTRFFKLQFFYVPVKRSHGTSFGACPPPRSQTSPPTDSPRHASPGELGTPW
 EESTNDISHYLGMLDPWYERNVLGLMHLPEVLCCQSLKAEQALEGSPQLPIADMLL
 YYCRFAARPVLLQVYQTELTFTIGEKTEIFIHSLLELGHSAATRAIKASGPGSKRLGIDG
 DREAVPLTLQIIYSKGAISGRSRWSNLEKVCTSVNLNACRKQEELDSSMEALTLNLTEV
 VKRQNSKSKKGFNQISTSQIKVDKVQIIIGNSNCPFAVCLDQDERKILQSVVRCEVSPCYK
 PEKSDLSSPPQTPPDLPAAAPDLCSLLCLPIMTFSGALP

<210> SEC ID Nº 6
 <211> LONGITUD: 1068
 <212> TIPO: PRT
 <213> ORGANISMO *Homo sapiens*
 <223> OTRA INFORMACIÓN: p110α de PI3K

<400> SECUENCIA: 6

MPPRPSSGELWGIHLMPPRIILVECLLPNGMIVTLECLREATLITIKHELKFEARKYPLHQ
LLQDESSYIFVSVTQEAEREFFDETRRLCDLRLFPFLKVIIEPVGNREEKILNREIGFA
IGMPVCEFDVMKDPEVQDFRRNILNVCKEAVDLRLNSPHSRAMYVYPPNVESSELPKH
IYNKLDKGQIIVVIWVIVSPNNDKQKYTLKINHDCVPEQVIAEAIKKTRSMLLSSEQLK
LCVLEYQGKYILKVCGCDEYFLEKYPLSQYKYIRSCIMLGMPNMLMLAKESLYSQLPMD
CFTMPSYSRRISTATPYMNGETSTKSLWVINSALRIKILCATYVNVNIRDIDKIYVRTGI
YHGGEPLCDNVNTQVRPCSNPRWNEWLNIDIYIPDLPRARLCLCSICSVKGRKGAKEEHC
PLAWGNINLFDYTDTLVSGKMALNLWPVPHGLEDLNPIGVGTGSPNPNKETPCLELEFDWF
SSVVKFPDMSVIEEHANWSVSREAGFSYSHAGLSNRLARDNELRENDKEQLKAISTRDPL
SEITEQEKFDFLWSHRHYCVTIPEILPKLLSVKWSNRDEVAQMYCLVKDWPPKPEQAME
LLDCNYPDPMVRGFAVRCLEKYLTDDKLSQYLIQLVQVLKYEQYLDNLLVRFLKALTN
QRIGHFFFWHLKSEMHNKTVSQRFGLLLESYCRACGMYLKHLNRQVEAMEKLINLTDLK
QEKKDETQVKQMKFLVEQMRPDMFMDALQGFLSPLNPAHQGLNLRLEECRIMSSAKRPLW
LNWENPDIMSELLFQNNIEIFKNGDDLQDMLTLQIIRIMENIWQNGQLDLRMLPYGCLS
IGDCVGLIEVVRNSHTIMQIQCKGGLKQALQFNSHTLHQWLKDKNKGEIYDAAIDLFTRS
CAGYCVATFILGIGDRHNSNIMVKDDQLFHIDFGHFLDHKKKFGYKRERVFPVLTQDF
LIVISKGAQECTKTREFERFQEMCYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLGSGMPELQSFDDIA
YIRKTLALDKTEQEALEYFMKQMNDAHHGGWTTKMDWIFHTIKQHALN

<210> SEC ID Nº 7
<211> LONGITUD: 1070
<212> TIPO: PRT
<213> ORGANISMO *Homo sapiens*
<223> OTRA INFORMACIÓN: p110β de PI3K

<400> SECUENCIA: 7

MCFSFIMPPAMADILDIWAVDSQIASDGSIPVDFLLPTGIYIQLEVPREATISYIKQMLW
KQVHNYPMFNLLMDIDSYMFACVNQTAVYEELEDETRRLCDVRPFLPVLKLVTRSCDPGE
KLDSKIGVLIGKGLHEFDSLKDPEVNEFRKMRKFSEEKILSLVGLSWMDWLKQTYPPHEH
EPSIPENLEDKLYGGKLI VAVHFENCQDVFSFQVSPNMNPIKVNELAIQKRLTIHGKED
VSPYDYVLQVSGRVEYVFGDHPLIQFYIRNCVMNRALPHFILVECKIKKMYEQEMIAI
EAAINRNSNLPLPLPPKKTRIISHVWENNPFQIVLVKGNKLNTEETVKVHVRAGLFHG
TELLCKTIVSSEVSGKNDHIWNEPLEFDINICDLPRMARLCFAVYAVLDKVKTKKSTKTI
NPSKYQTIKAGKVHYVPAWVNTMVFDFKGQLRTGDIILHSWSSFPDELEMLNPMGTVQ
TNPYTENATALHVKFENKKQPYYPFDKIIEKAAEIASSDSANVSSRGKKFLPVLKE
ILDRDPLSQLCENEMDLIWTLRQDCREIFPQSLPKLLLSIKWNKLEDVAQLQALLQIWP
LPPREALELLDFNYPDQYVREYAVGCLRQMSDEELSQYLLQLVQVLKYEPLDLCALSRFL
LERALGNRRIGQFLFWHLRSEVHIPAVSVQFGVILEAYCRGSVGHMKVLSKQVEALNKLK

TLNSLIKLNAVKLNRAKGEAMHTCLKQSAYREALSDLQSPNLCVILSELYVECKYMD
SKMKPLWL VYNNKVFGEDEVGIFKNGDDLQDMLTLQMLRLMDLLWKEAGLDLRMLPYG
CLATGDRSGLIEVVSTSETIADIQLNSSNVAAAAAFNKDALLNWLKEYNSGDDLDRADIEE
FTLSCAGYCVASYVLGIGDRHSDNIMVKKTGQLFHIDFGHILGNFKSKFGIKRERVFIL
TYDFIHVIQGGKTGNTKFGFRQCCEDAYLILRRHGNLFITL FALMLTAGLPELTSVKD
IQYLDKSLALGKSEEEALKQFKQKQFDEALRESWTTKVNWMAHTVRKDYRS

<210> SEC ID Nº 8
<211> LONGITUD: 1102
<212> TIPO: PRT
<213> ORGANISMO *Homo sapiens*
<223> OTRA INFORMACIÓN: p110γ de PI3K

<400> SECUENCIA: 8

MELNYKQPVVLRDNCRRRRMKPRSAASLSSMELIPIEFVLPTSQRKCKSPETALLH
VAGHGNVEQMKQAQVWLRALETSVAADFYHRLGPHHFLLLYQKKGQWYEIYDKYQVVTLD
CLRYWKATHRSPGQIHLVQRHPPSEESQAFQRLTALIGYDVTDSNVHDDELEFTRRGL
VTPRMAEVASRDPKLYAMHPWVTSKPLPEYLWKKIANNCIFIVIHRSSTTSQTIKVSDDT
PGAILQSFFTKMAKKSLMDIPESQSEQDFVLRVCGRDEYLVGETPIKNFQWVRHCLKNG
EEIHVVLDTPDPALDEVKKEEWPLVDDCTGVTGYHEQLTIHGKDHESVFTVSLWDCDRK
FRVKIRGIDIPVLPRNTDLTVFEANIQHGGQVLCQRRTSPKPFTEEVWLVNWFLEFSIKI
KDLPGKALLNLQIYCGKAPALSSKASAESPSSESCKGVQLLYVNNLLIDHRFLLRGEY
VLHMWQISGKGEDQGSFNADKLTSTNPDKENSMSISILLDNYCHPIALPKHQPTDPEG
DRVRAEMPQLRKQLEAIATDPLNPLTAEDKELLWHFRYESLKHPKAYPKLFSSVKWGQ
QEIVAKTYQLLARREVWDQSALDVGLTMQLLDCNFSDENVRRAIVQKLESLEDDDLVHYL
LQLVQAVKFEPYHDSALARFLLKRGRLNRKIGHFLFWFLRSEIAQSRHYQQRFAVILEAY
LRGCGTAMLDFTQQVQVIEMLQKVTLDIKSLSAEKYDVSSQVISQLKQKLENLQNSQLP
ESFRVPYDPGLKAGALAIKCKVMASKKPLWLEFKCADPTALSNETIGIIFKHGDDLRO
DMLILQILRIMESIWETESLDLCLLPYGCISTGDKIGMIEIVKDATTIAKIQQSTVGNIG
AFKDEVLNHWLKEKSPTEEFQAAVERFVYSCAGYCVATFVLGIGDRHNDNIMITETGNL
FHIDFGHILGNYSFLGINKERVFPVLTDFLVMGTSGKKTSPHFQKFQDQICVKAYLAL
RHHTNLLIILFSMMLMTGMPQLTSKEDI EYIRDALTVGKNEEDAKKYFLDQIEVCRDKGW
TVQFNWFLHLVLGKQGEKHS

<210> SEC ID Nº 9
<211> LONGITUD: 1044
<212> TIPO: PRT
<213> ORGANISMO *Homo sapiens*
<223> OTRA INFORMACIÓN: p110δ de PI3K

<400> SECUENCIA: 9

MPPGVDCPMÉFWTKENQSVVVDFFLLPTGVYLNFPVSRNANLSTIKQLLWHRAQYEPFLFH
MLSGPEAYVFTCINQTAEQELEDQRRLCDVQPFPLPVLRLVAREGDRVKKLINSQISLL
IGKGLHEFDSLCDPEVNDFRAKMCQFCEBAAARRQQLGWEAWLQYSFPLQLEPSAQTWGP
GTLRLPNRALLVNVKFEQSEESFTFQVSTKDVPLALMACALRKKATVFRQPLVEQPEDYT
LQVNGRHELYGYSYPLCQFYICSLHSGLTPLHTMVHSSSILAMRDEQSNPAPQVQKPR
AKPPPIPAKKPSSVLSWLEQPFRIELIQGSKVNADERMKLVVQAGLPHGNEMLCCTVSS
SEVSVCEPVMKQRLFEFDINICDLPRMARLCFALYAVIEKAKKARSTKKSKKADCPAIW
ANLMLFDYKQKLTGERCLYMWPSPVDEKGEILLNPTGTVRSNPNTDSAAALLICLPEVAP
HPVYYPALEKILELGRHSECVHVTBEEQLQREILERRGSGELYEHEKDLVWKLREHVQE
HFPEALARLLLVTKNKHEDVAQMLYLLCSWPPELPVLSALELLDFSPDCHVGSPFAIKSL
RKLTDDDELQYLLQVLQVLYESYLDCELTCKFLDLRALANRKGHFLFWHLRSEMHVPSV
ALRFGILILEAYCRGSTHMKVLMKQGEALSCLKALNDFVKLSSQKTPKPKTKELMHLCMR
QEAYLEALSHLQSPLDPLTLAEVCVEQCTFMDSKMKPLWIMYSNEEAGSGGSGVGIIFKN
GDDLRLQDMLTLQMIQLMDVLWKQEGDLRLMTPYGCCLPTGDRGTGLIEVVLRSDTIANIQLN

KSNMAATAAFNKDALLNWLKSKNPGEALDRAIEEFTLSCAGYCVATYVLGIGDRHSDNIM
IRESGQLFHIIDFGHFLGNFKTKFGINRERVFIILTYDFVHVIQGGKTNNSEKFERFRGYC
ERAYTILRRHGLFLHLFALMRAAGLPELSCSKDIQYLKDSLALGKTEEBALKHFRVKFN
EALRESWKTKVNWLAHNVSKDNRQ

<210> SEC ID Nº 10
<211> LONGITUD: 17
<212> TIPO: PRT
<213> ORGANISMO *Homo sapiens*

<<220> CARACTERÍSTICA:

<221> NOMBRE/CLAVE: MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> OTRA INFORMACIÓN: FOSFORILACIÓN; la tirosina en la posición 10 está fosforilada

<400> SECUENCIA: 10
CGFAEPYNLYSSLKEKV

<210> SEC ID Nº 11
<211> LONGITUD: 15

<212> TIPO: PRT
<213> ORGANISMO *Homo sapiens*

5 <<220> CARACTERÍSTICA:
<221> NOMBRE/CLAVE: MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> OTRA INFORMACIÓN: FOSFORILACIÓN; la tirosina en la posición 9 está fosforilada

10 <400> SECUENCIA: 11
CSKEYDRLYEEYTRT

15 <210> SEC ID Nº 12
<211> LONGITUD: 128
<212> TIPO: PRT
<213> ORGANISMO *Homo sapiens*
<223> OTRA INFORMACIÓN: antígeno p110 de PI3K

<400> SECUENCIA: 12
MPPRPSSGELWGIHLMPPRIILVECLLPNGMIVTLECLREA
TLVTIKHELFKEARKYPLHQLQDESSYIFVSVTQEAERE
EFFDETTRLCDLRLFPFLKVI EPVGNREEKLNREIGFAI
20 GMPVCE

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, cáncer, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK), en el que la medición comprende:

(i) incubar un extracto celular con una, o una pluralidad, de series de dilución de anticuerpos de captura, para formar una pluralidad de analitos RTK capturados, en el que el extracto celular se aísla de un sujeto que tiene cáncer después de la administración de un fármaco contra el cáncer o en el que el extracto celular se pone en contacto con un fármaco contra el cáncer;

(ii) incubar la pluralidad de analitos capturados con anticuerpos de detección que comprenden un primer anticuerpo, o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de un estado de activación y un segundo anticuerpo, o una pluralidad de segundos anticuerpos independientes de un estado de activación, específicos de un primer y un segundo elemento, respectivamente, de un par de analitos dimerizado para formar una pluralidad de analitos dimerizados capturados detectables, en el que los primeros anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con un primer elemento de un par de amplificación de señal y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se canaliza hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal;

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

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

(b) seleccionar un fármaco contra el cáncer comparando la dimerización de al menos dos RTK con un perfil de dimerización de referencia de los mismos dos RTK, en el que el perfil de dimerización de referencia se genera en ausencia del fármaco contra el cáncer.

2. El método de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende calibrar el nivel de dimerización de al menos dos RTK con respecto a una curva patrón generada para dichos al menos dos RTK.

3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fármaco contra el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un compuesto modulador de PI3K, un compuesto modulador de RTK, o una combinación de los mismos.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos al menos dos RTK son un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dímero de HER1/HER2, un dímero de HER1/HER3, un dímero de HER2/HER3, un dímero de HER2/HER2, un dímero de HER2/HER4, un dímero de p95HER2/HER3 y un dímero de p95HER2/HER2.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto celular se aísla de un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de pulmón, pancreático, colorrectal o gástrico.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, i) en el que los primeros anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan directamente con el grupo funcional facilitador; y

ii) en el que los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan directamente con el primer elemento del par de amplificación de señal.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, i) en el que los segundos anticuerpos independientes de un estado de activación se marcan con el primer elemento del par de amplificación de señal mediante la unión entre un primer elemento de un par de unión conjugado con los anticuerpos independientes de un estado de activación y un segundo elemento del par de unión conjugado con el primer elemento del par de amplificación de señal; y

ii) en el que el primer elemento del par de unión es biotina y/o el segundo elemento del par de unión es estreptavidina.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grupo funcional facilitador es glucosa oxidasa.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer elemento del par de amplificación de señal es una peroxidasa.

10. Un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, cáncer, comprendiendo el método:

(a) medir el nivel de activación de un complejo de PI3K, en el que dicho complejo de analito de PI3K comprende i) la dimerización de al menos dos receptores tirosina quinasa (RTK); y ii) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K, comprendiendo dicha medición:

(i) incubar un extracto celular con una, o una pluralidad, de series de dilución de anticuerpos de captura para formar una pluralidad de analitos capturados, en el que el extracto celular se aísla de un sujeto que tiene cáncer después de la administración de un fármaco contra el cáncer o en el que el extracto celular se pone en contacto con un fármaco contra el cáncer;

(iia) incubar la pluralidad de analitos capturados con primeros anticuerpos de detección que comprenden bien a) un primer anticuerpo, o una pluralidad de primeros anticuerpos, independientes de un estado de activación, específicos de un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado o b) una subunidad p110 de PI3K; y segundos anticuerpos de detección que comprenden bien a) un segundo anticuerpo, o una pluralidad de segundos anticuerpos, independientes de un estado de activación, específicos del otro elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado, una subunidad p85 de PI3K o una subunidad p110 de PI3K o b) anticuerpos dependientes de un estado de activación específicos de una subunidad p85 de PI3K y/o de una subunidad p110 de PI3K para formar una pluralidad de analitos dimerizados y formando complejo, capturados detectables, o

(iib) incubar la pluralidad de analitos capturados con primeros anticuerpos de detección que comprenden un primer o una pluralidad de primeros anticuerpos independientes de un estado de activación, específicos de una subunidad p110 de PI3K; y segundos anticuerpos de detección que comprenden bien a) un segundo anticuerpo, o una pluralidad de segundos anticuerpos independientes de un estado de activación, específicos de un elemento de un par de receptores tirosina quinasa dimerizado, o una subunidad p85 de PI3K o b) anticuerpos dependientes de un estado de activación específicos de una subunidad p85 de PI3K para formar una pluralidad de analitos dimerizados y formando complejo, capturados detectables, en el que los primeros anticuerpos de detección se marcan con un grupo funcional facilitador, los segundos anticuerpos de detección se marcan con un primer elemento de un par de amplificación de señal, y el grupo funcional facilitador genera un agente oxidante que se canaliza hacia, y reacciona con, el primer elemento del par de amplificación de señal;

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

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

(b) seleccionar un fármaco contra el cáncer comparando el nivel de activación del complejo PI3K con un perfil de activación del complejo PI3K de referencia en el que el perfil de dimerización de referencia se genera en ausencia del fármaco contra el cáncer.

11. El método de la reivindicación 10, en el que el método comprende adicionalmente calibrar el nivel del complejo PI3K con respecto a una curva patrón generada para dicho complejo PI3K que comprende i) la dimerización de al menos dos receptores de tirosina quinasa (RTK); ii) una subunidad p85 de PI3K y una subunidad p110 de PI3K.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en el que dichas al menos dos RTK son un elemento seleccionado del grupo que consiste en un dímero de HER1/HER2, un dímero de HER1/HER3, un dímero de HER2/HER3, un dímero de HER2/HER2, un dímero de HER2/HER4, un dímero de p95HER2/HER3 y un dímero de p95HER2/HER2.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el extracto celular se aísla de un sujeto que tiene, o que se sospecha que tiene, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, de pulmón, pancreático, colorrectal o gástrico.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que los primeros anticuerpos de detección se marcan directamente con el grupo funcional facilitador.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en el que los segundos anticuerpos de detección se marcan directamente con el primer elemento del par de amplificación de señal.

16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 10-15, en el que los segundos anticuerpos de detección se marcan con el primer elemento del par de amplificación de señal a través de la unión entre un primer elemento de un par de unión conjugado con los segundos anticuerpos de detección y un segundo elemento del par de unión conjugado con el primer elemento del par de amplificación de señal.

17. El método de la reivindicación 16, en el que el primer elemento del par de unión es biotina y/o el segundo elemento del par de unión es estreptavidina.

18. El método de la reivindicación 14, en el que el grupo funcional facilitador es glucosa oxidasa.

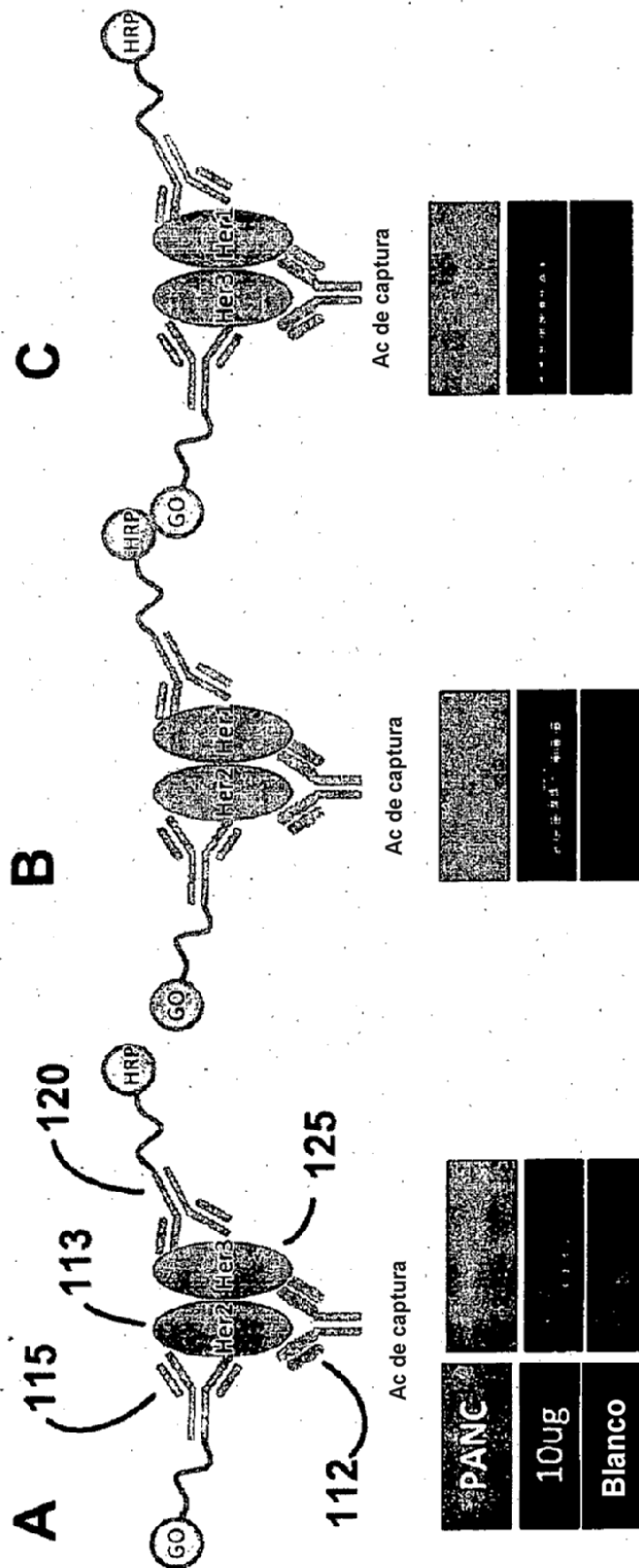
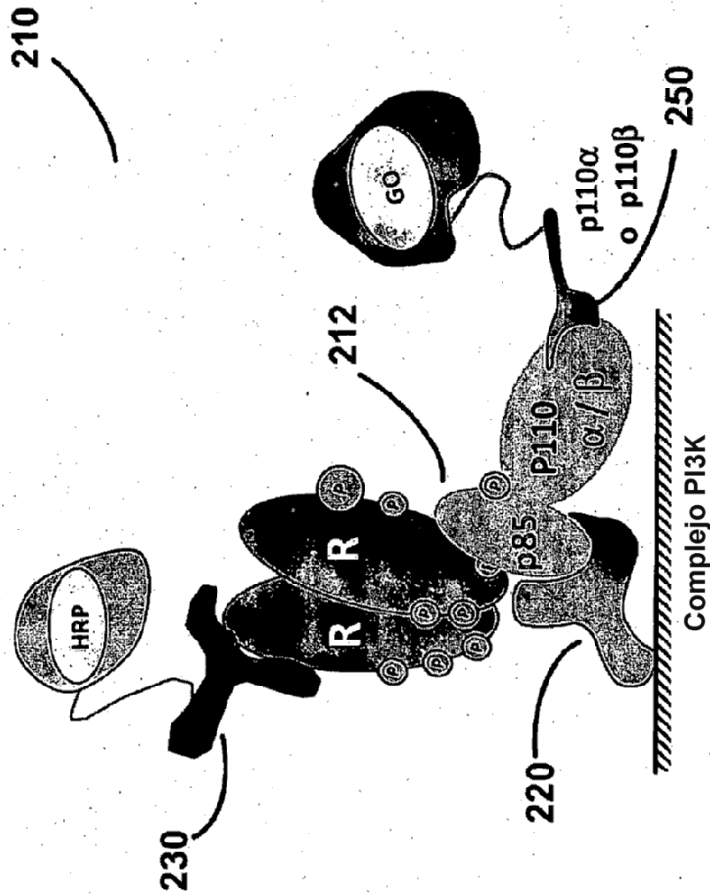
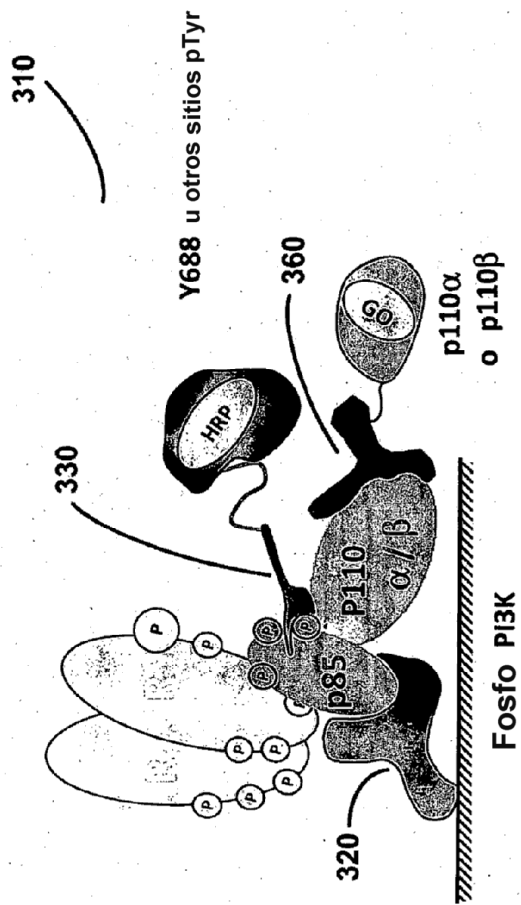


FIG. 1



R: Proteínas RTK (HER1, HER2, HER3, cMET) y adaptadoras
P : Restos fosforilados
GO : Glucosa oxidasa
HRP: Peroxidasa de rábano picante

FIG. 2



R: Proteínas RTK (HER1, HER2, HER3, cMET) y adaptadoras
P : Restos fosforilados
GO : Glucosa oxidasa
HRP: Peroxidasa de rábano picante

FIG. 3

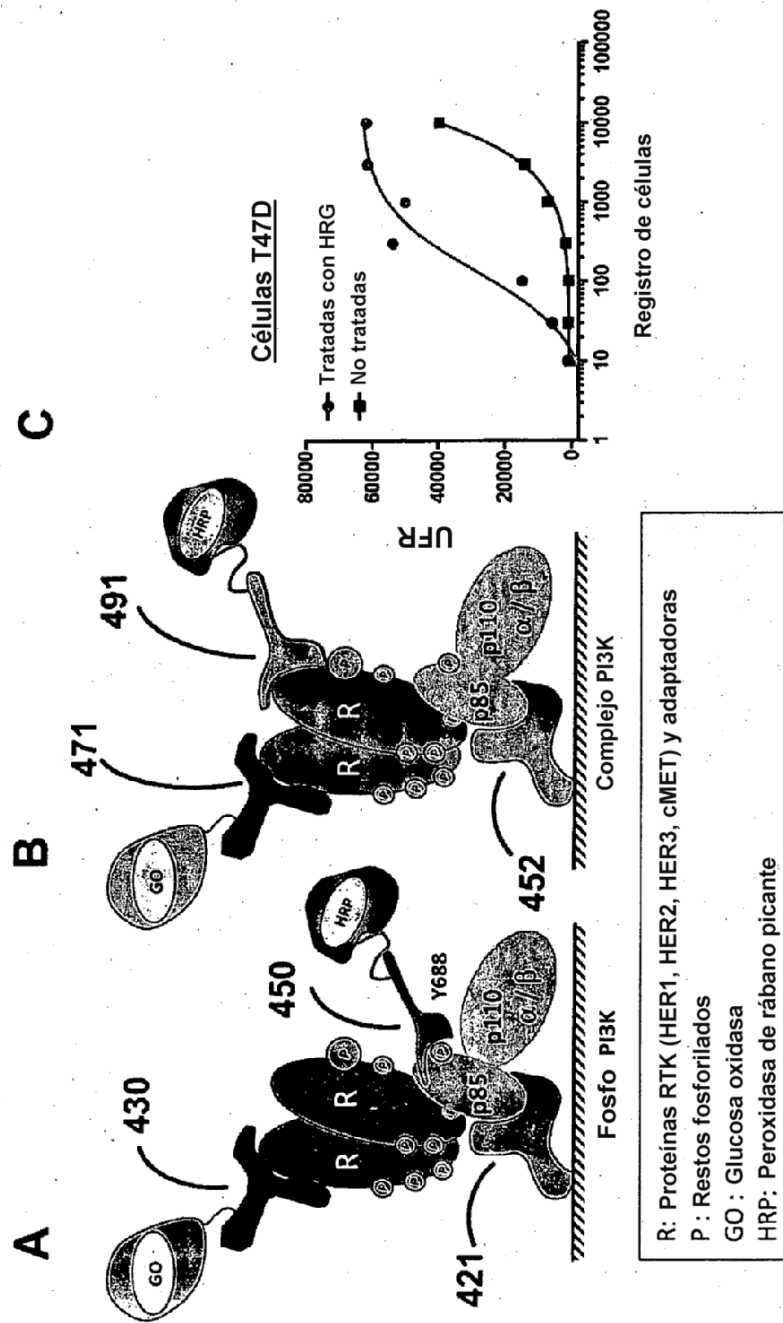


FIG. 4

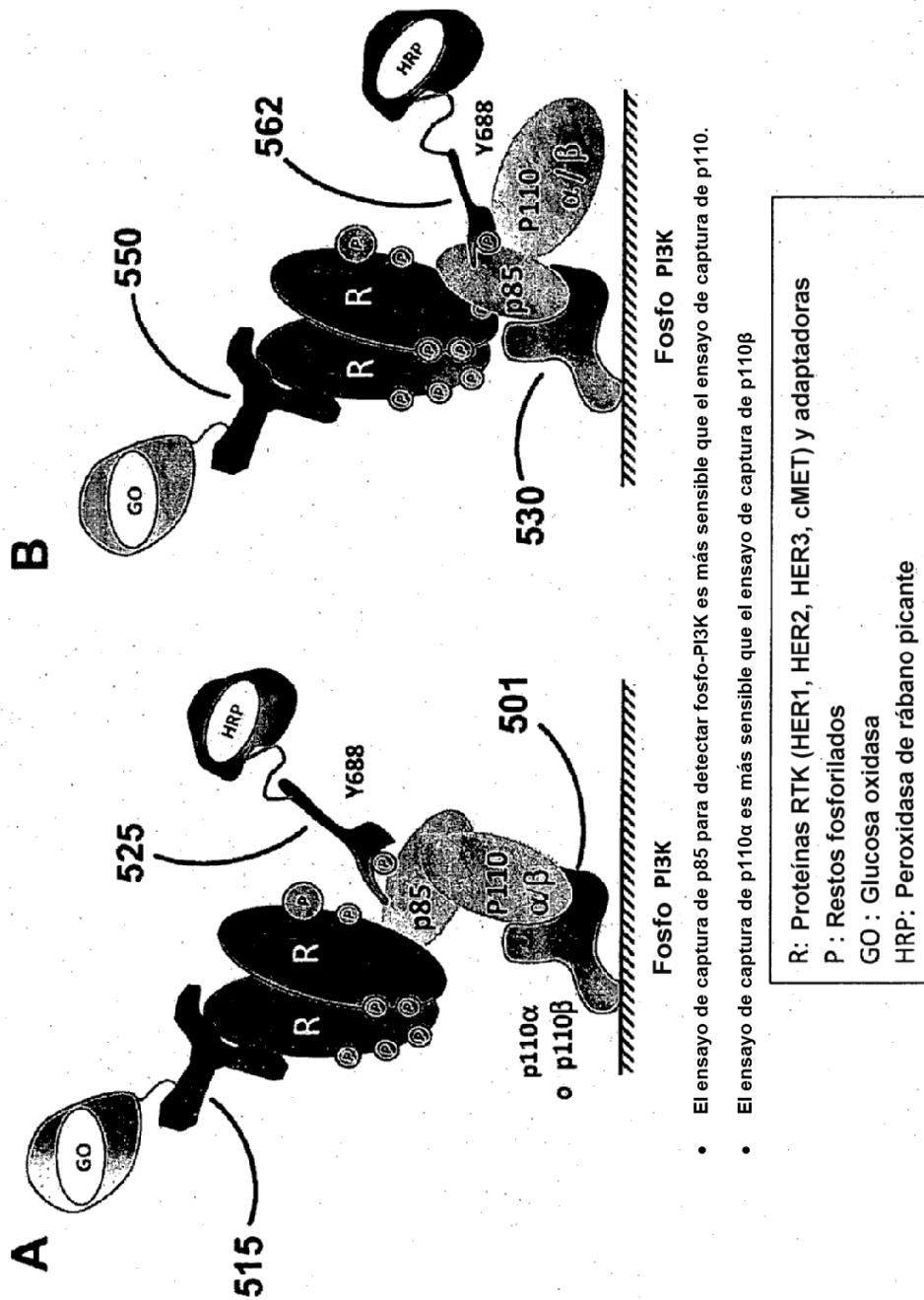


FIG. 5

- El ensayo de captura de p85 para detectar fosfo-PI3K es más sensible que el ensayo de captura de p110.
- El ensayo de captura de p110α es más sensible que el ensayo de captura de p110β

Límite de PI3K ≥ 60						
PI3K Y AKT	✓✓	✓x	xx✓	xx	recuento PI3K pos	recuento AKT pos
Límite de AKT ≥ 24	17	4	20	19	21	37
Límite de AKT ≥ 8	19	2	26	13	21	45
						valor p
						0,0222
						0,0385

Y solo para mostrar el uso del mismo límite para PI3K y AKT (aunque eso no tiene sentido basándose en los límites del ensayo):

Límite de PI3K ≥ 24						
PI3K Y AKT	✓✓	✓x	xx✓	xx	PI3K pos	AKT pos.
AKT ≥ 24	24	6	13	17	30	37
						valor p
						0,00364

FIG. 6

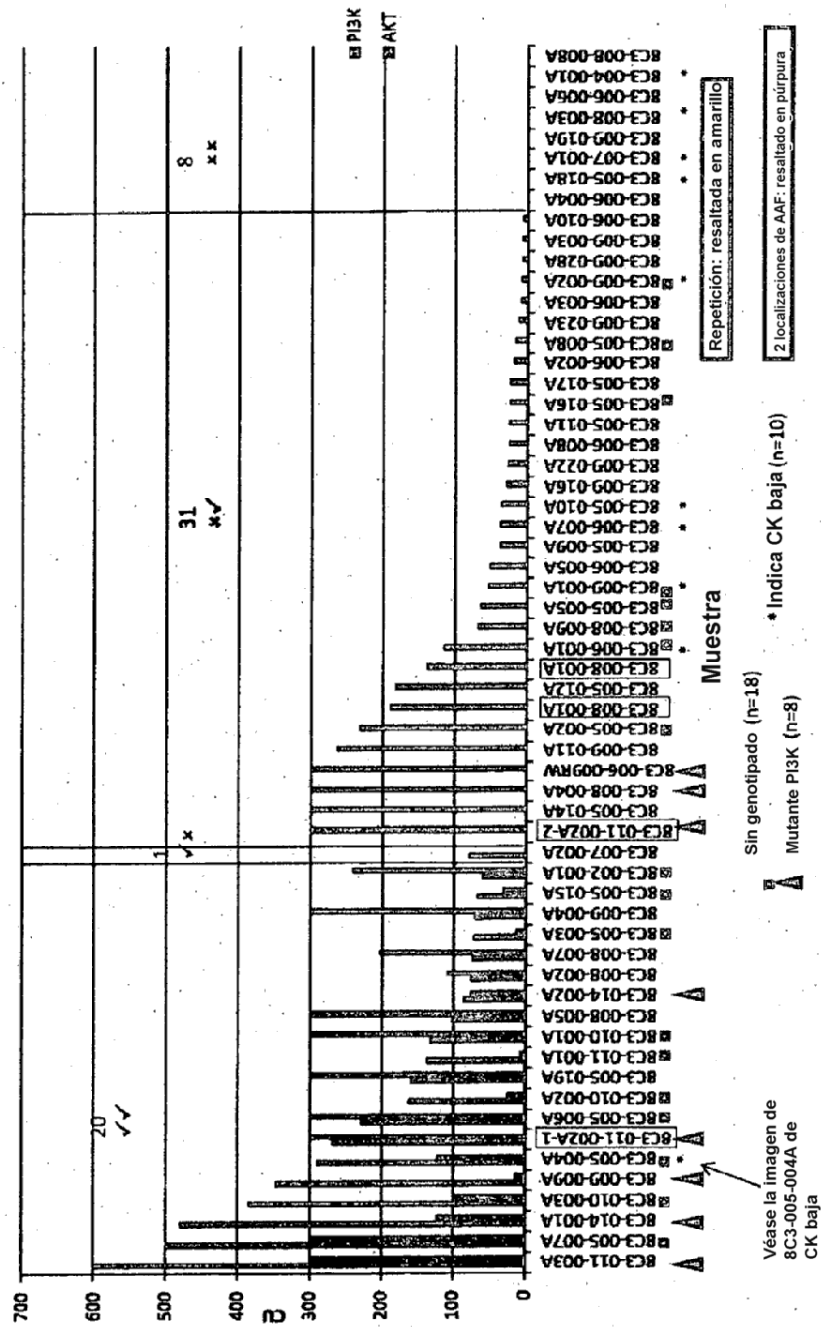
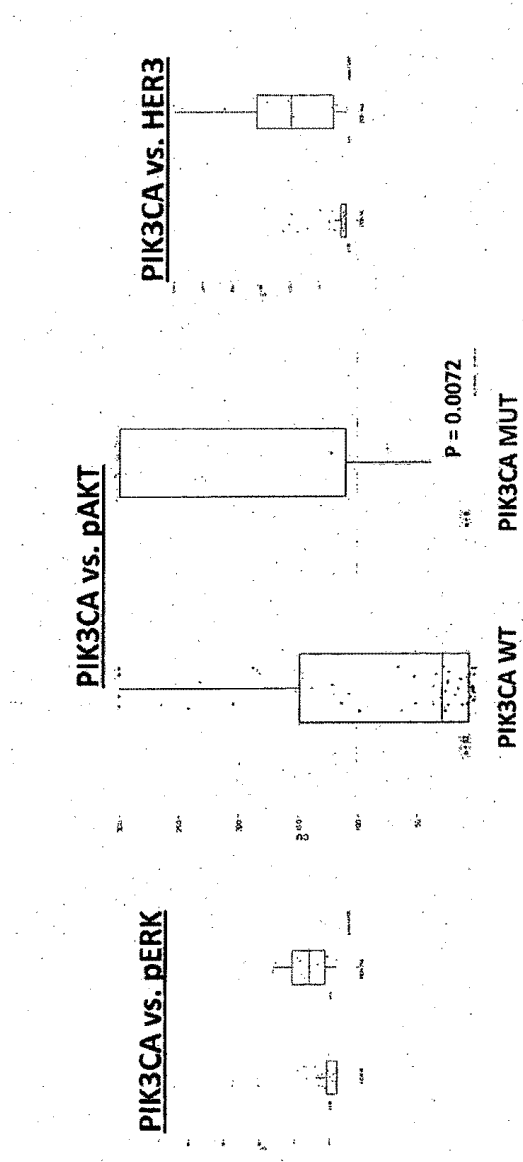


FIG. 7



- ☐ Aunque se muestra una buena correlación, la selección de pacientes basada en mutaciones puede dejar pacientes que pueden beneficiarse.
- ☐ En CA de mama se encontró buena correlación pero análisis similares no revelaron buena correlación entre dianas de mutación y aguas abajo en otros cánceres.
- ☐ La combinación del panel de ruta de activación + mutación es ideal en el entorno clínico

FIG. 8

Límite de PI3K ≥ 30						
PI3K Y HER3-P	PI3K $\uparrow$ HER3-P $\uparrow$ ✓✓	PI3K $\uparrow$ HER3-P $\downarrow$ ✓x	PI3K $\downarrow$ HER3-P $\uparrow$ xx✓	PI3K $\downarrow$ HER3-P $\downarrow$ xx	N.º PI3K + N.º HER3-P +	N.º de muestras valor p
HER3-P ≥ 30	24	3	11	22	27 35	60 0,0000116
Límite de PI3K ≥ 60						
PI3K Y HER3-P	PI3K $\uparrow$ HER3-P $\uparrow$ ✓✓	PI3K $\uparrow$ HER3-P $\downarrow$ ✓x	PI3K $\downarrow$ HER3-P $\uparrow$ xx✓	PI3K $\downarrow$ HER3-P $\downarrow$ xx	N.º PI3K + N.º HER3-P +	N.º de muestras valor p
HER3-P ≥ 30	20	1	15	24	21 35	60 0,0000105
Límite de PI3K ≥ 90						
PI3K Y HER3-P	PI3K $\uparrow$ HER3-P $\uparrow$ ✓✓	PI3K $\uparrow$ HER3-P $\downarrow$ ✓x	PI3K $\downarrow$ HER3-P $\uparrow$ xx✓	PI3K $\downarrow$ HER3-P $\downarrow$ xx	N.º PI3K + N.º HER3-P +	N.º de muestras valor p
HER3-P ≥ 30	13	0	22	25	13 35	60 0,000286

FIG. 9

Límite de HER3-P ≥ 30					
HER3-P Y AKT	HER3 $\uparrow$ AKT $\uparrow$ ✓✓	HER3 $\uparrow$ AKT $\downarrow$ ✓x	HER3 $\downarrow$ AKT $\uparrow$ xx✓	HER3 $\downarrow$ AKT $\downarrow$ xx	valor p
	33	2	18	7	0,022
Límite de AKT ≥ 4					

FIG. 10

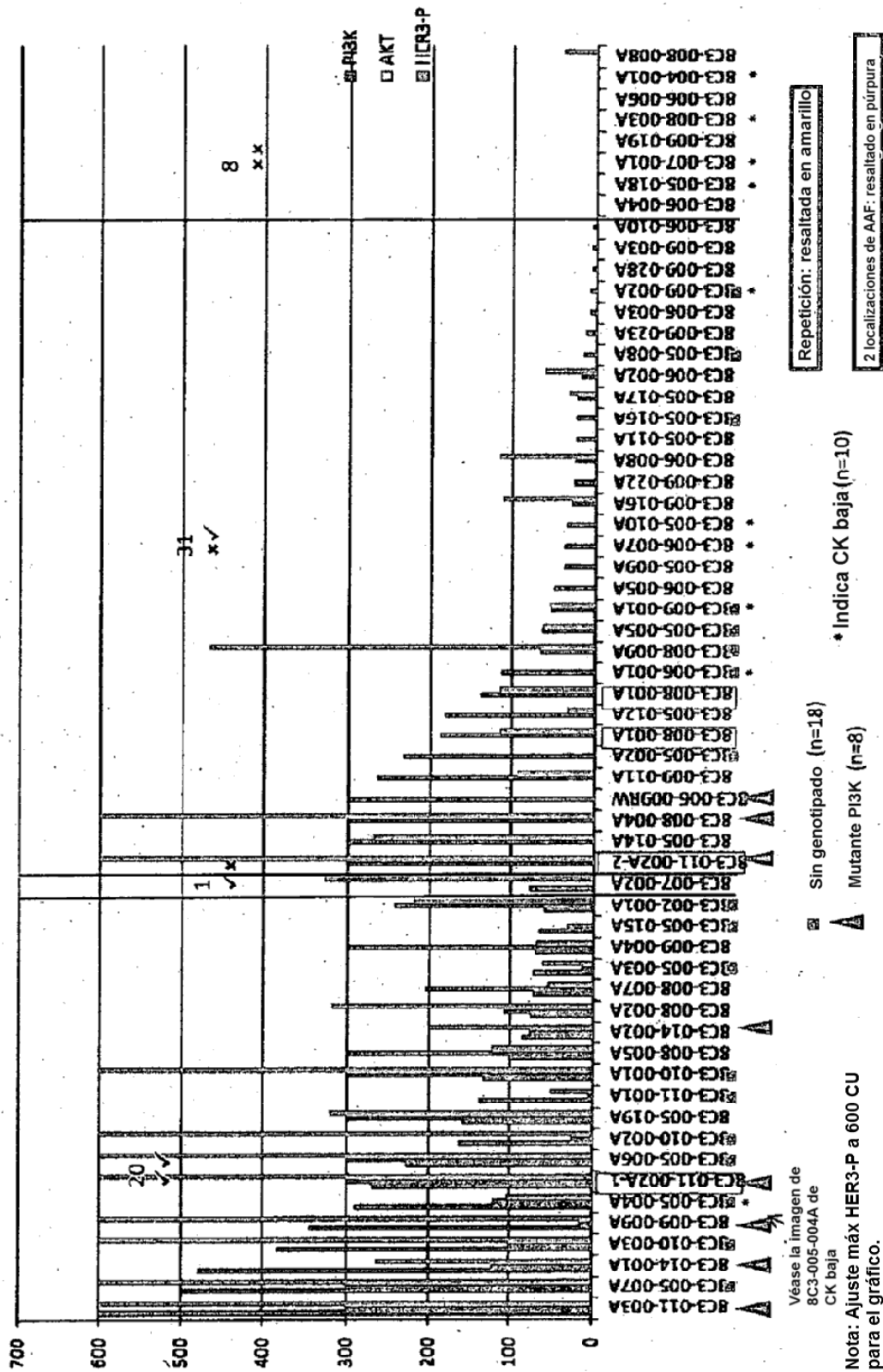


FIG. 11

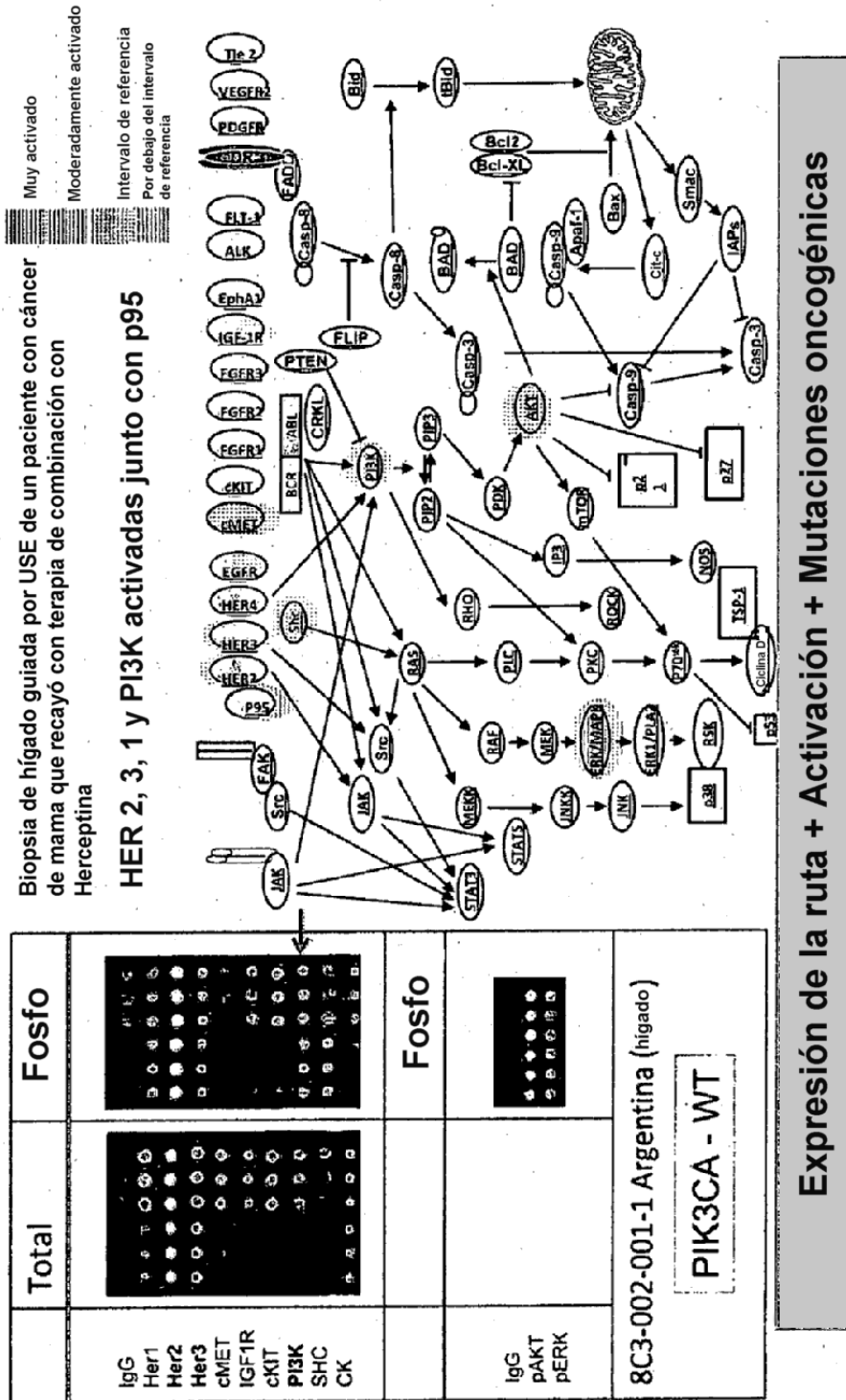
Límite de HER2-P ≥ 30						
HER2-P	HER2-P ↑↑ P13K ↑	HER2-P ↑ P13K ↓	HER2-P ↓ P13K ↑	HER2-P ↓↓ P13K ↓	N.º HER2-P +	N.º de muestras
Límite de P13K ≥ 90	9	9	4	38	18	60
Límite de P13K ≥ 60	12	6	9	33	18	60
Límite de P13K ≥ 30	14	4	13	29	18	60
HER2-P	HER2-P ↑↑ AKT ↑	HER2-P ↑ AKT ↓	HER2-P ↓ AKT ↑	HER2-P ↓↓ AKT ↓	N.º AKT +	N.º de muestras
Límite de AKT ≥ 16	17	1	24	18	41	60
Límite de AKT ≥ 8	18	0	27	15	45	60
Límite de AKT ≥ 4	18	0	33	9	51	60

Límite de HER2-P ≥ 1						
HER2-P	HER2-P ↑↑ P13K ↑	HER2-P ↑ P13K ↓	HER2-P ↓ P13K ↑	HER2-P ↓↓ P13K ↓	N.º HER2-P +	N.º de muestras
Límite de P13K ≥ 90	11	17	2	30	28	60
Límite de P13K ≥ 60	17	11	4	28	28	60
Límite de P13K ≥ 30	21	7	6	26	28	60
HER2-P	HER2-P ↑↑ AKT ↑	HER2-P ↑ AKT ↓	HER2-P ↓ AKT ↑	HER2-P ↓↓ AKT ↓	N.º AKT +	N.º de muestras
Límite de AKT ≥ 16	25	3	16	16	41	60
Límite de AKT ≥ 8	26	2	19	13	45	60
Límite de AKT ≥ 4	26	2	25	7	51	60

FIG. 12

Límite de HER2-P ≥ 1						
HER2-P	HER2- P $\uparrow$ PI3K $\uparrow$ ✓✓	HER2- P $\uparrow$ PI3K $\downarrow$ ✓x	HER2- P $\downarrow$ PI3K $\uparrow$ x✓	HER2- P $\downarrow$ PI3K $\downarrow$ xx	N.º de muestras	valor p
Límite de PI3K ≥ 30	5	1	3	15	24	0,00686
HER2-P	HER2- P $\uparrow$ AKT $\uparrow$ ✓✓	HER2- P $\uparrow$ AKT $\downarrow$ ✓x	HER2- P $\downarrow$ AKT $\uparrow$ x✓	HER2- P $\downarrow$ AKT $\downarrow$ xx	N.º de muestras	valor p
Límite de AKT ≥ 16	5	1	9	9	24	0,171
Límite de AKT ≥ 8	5	1	11	7	24	0,319
Límite de AKT ≥ 4	5	1	15	3	24	0,749

FIG. 13



IGF1R – Identifica una oportunidad terapéutica direccionable

FIG. 14

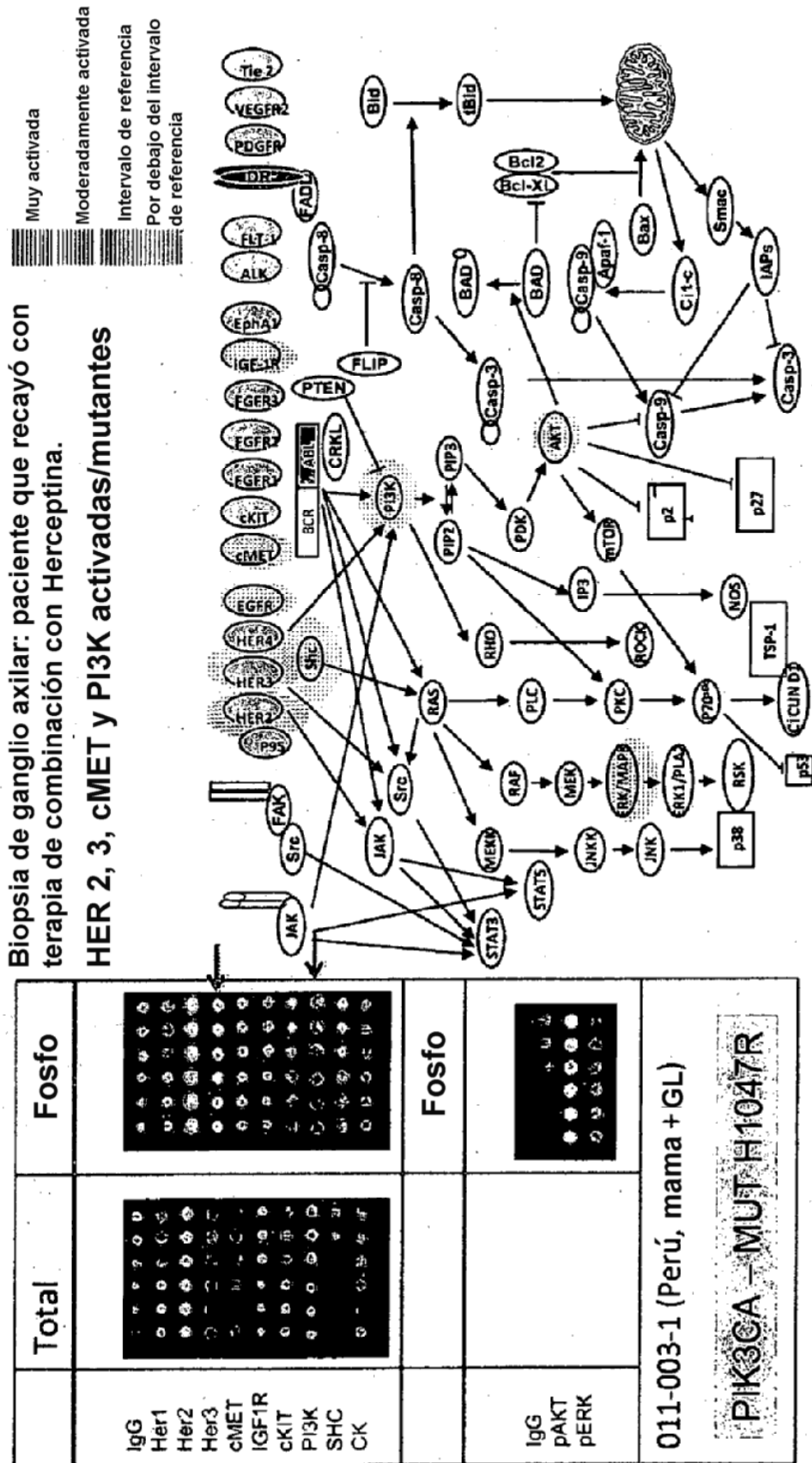


FIG. 15

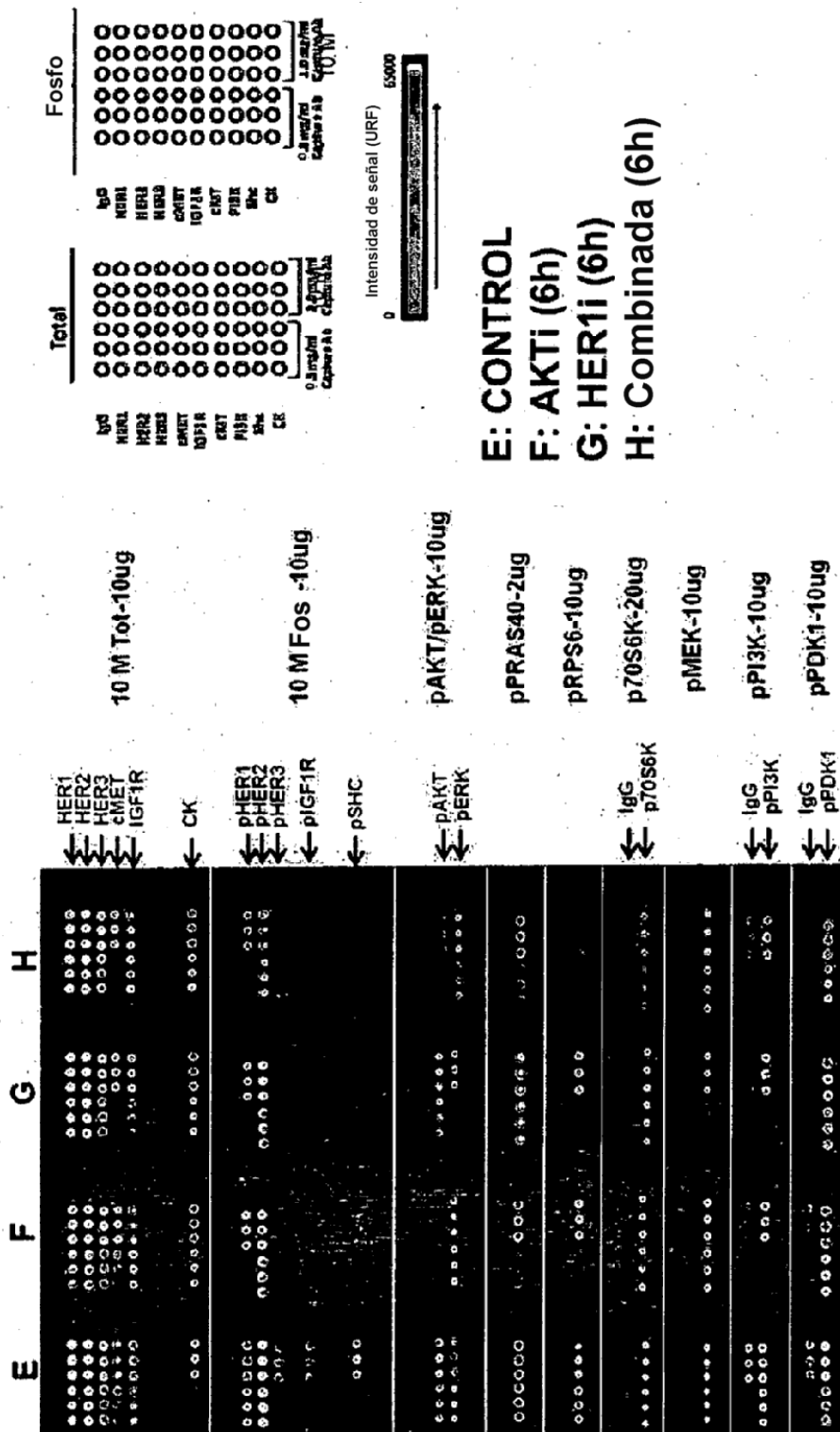


FIG. 16

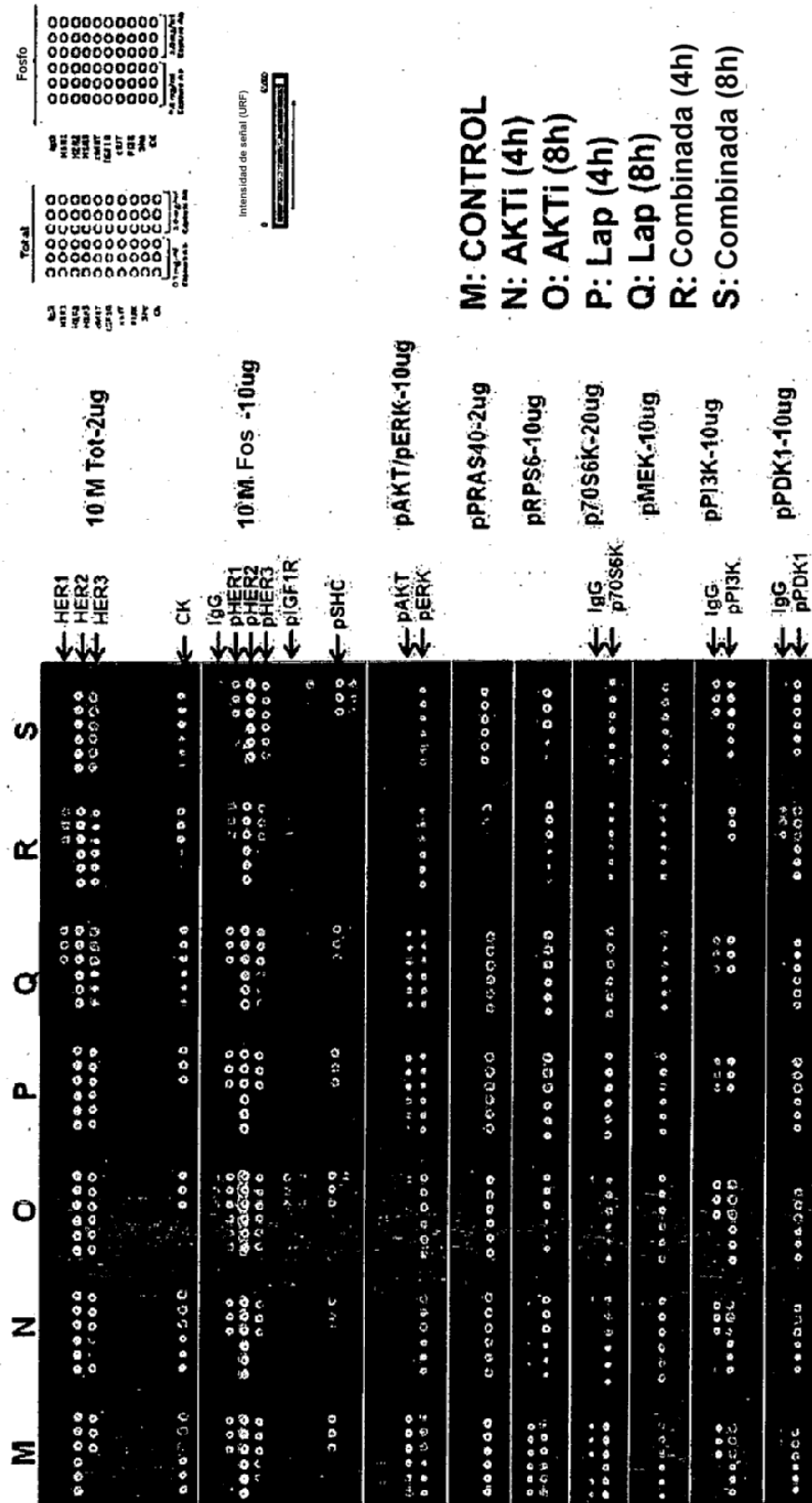
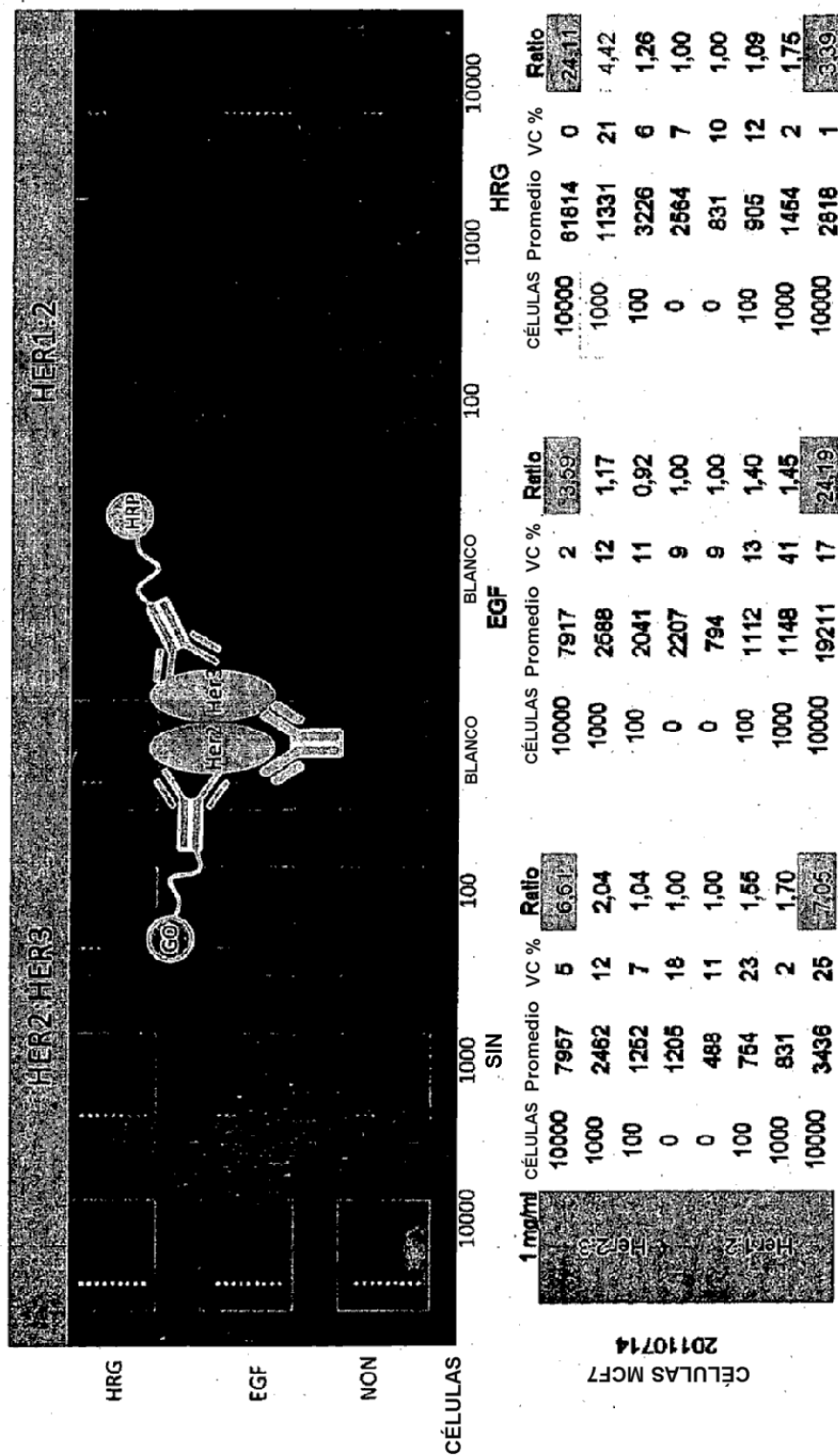


FIG. 17



Muestra	Her1:2	Her2:3	Her1:3	Her3:PI3K
HPDE	10-494	10-494	10-494	10-494
Tumor pancreático	10-494	10-494	10-494	10-494
Blanco	10-494	10-494	10-494	10-494

Figura xx. Complejos de heterodímeros de células HPDE y de la muestra tumoral 10-494. El ensayo de dímeros CEER™ se realizó a 10 µg, 5 µg y 2 µg usando una combinación de anticuerpos de captura y anticuerpos de detección múltiple. Se muestran datos de 5 µg para todos los complejos, excepto para el complejo HER3/PI3K a 10 µg. Las células HPDE y la muestra tumoral 10-494 forma complejos 1:2 y 2:3, respectivamente. En lo que respecta a las células HPDE, la muestra tumoral tiene niveles más altos de fosfo-HER3 y están asociados con PI3K para formar un complejo HER3/PI3K.

Complejos de heterodímeros

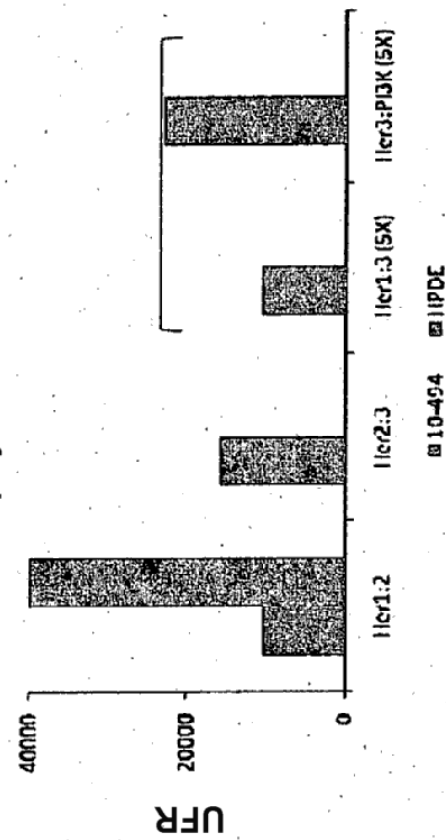


FIG. 19

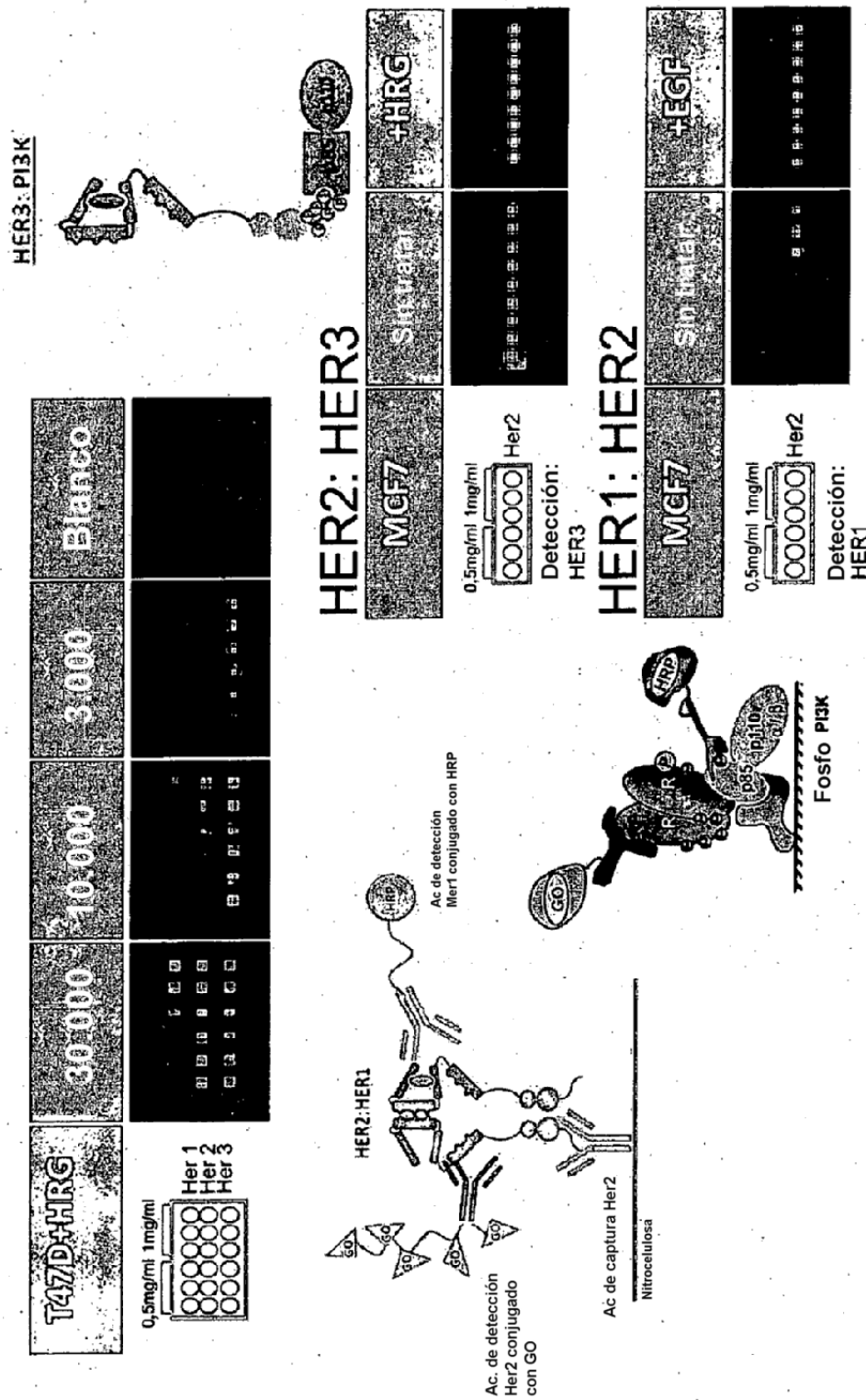
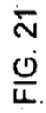
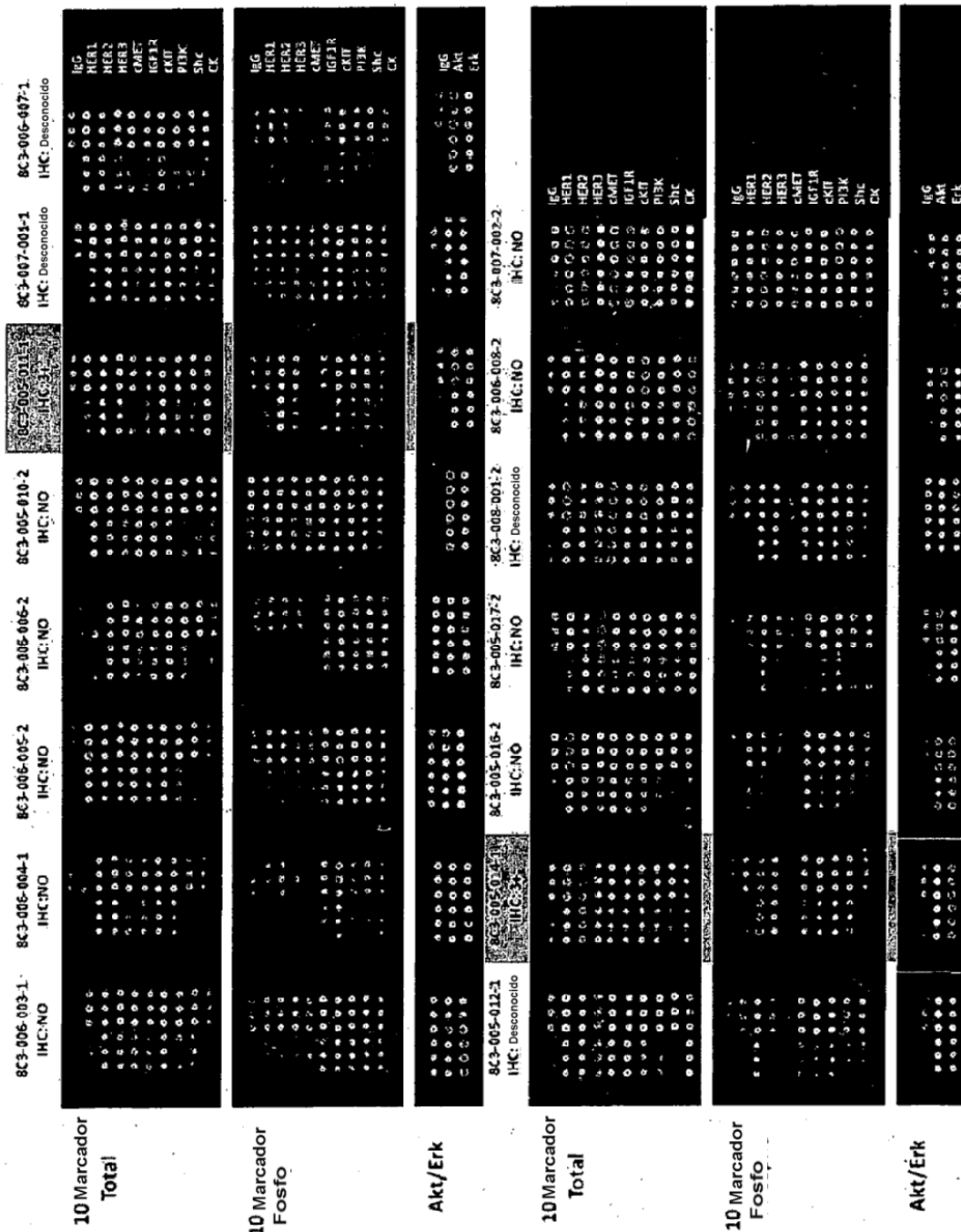


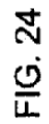
FIG. 20





[illegible]

FIG. 23



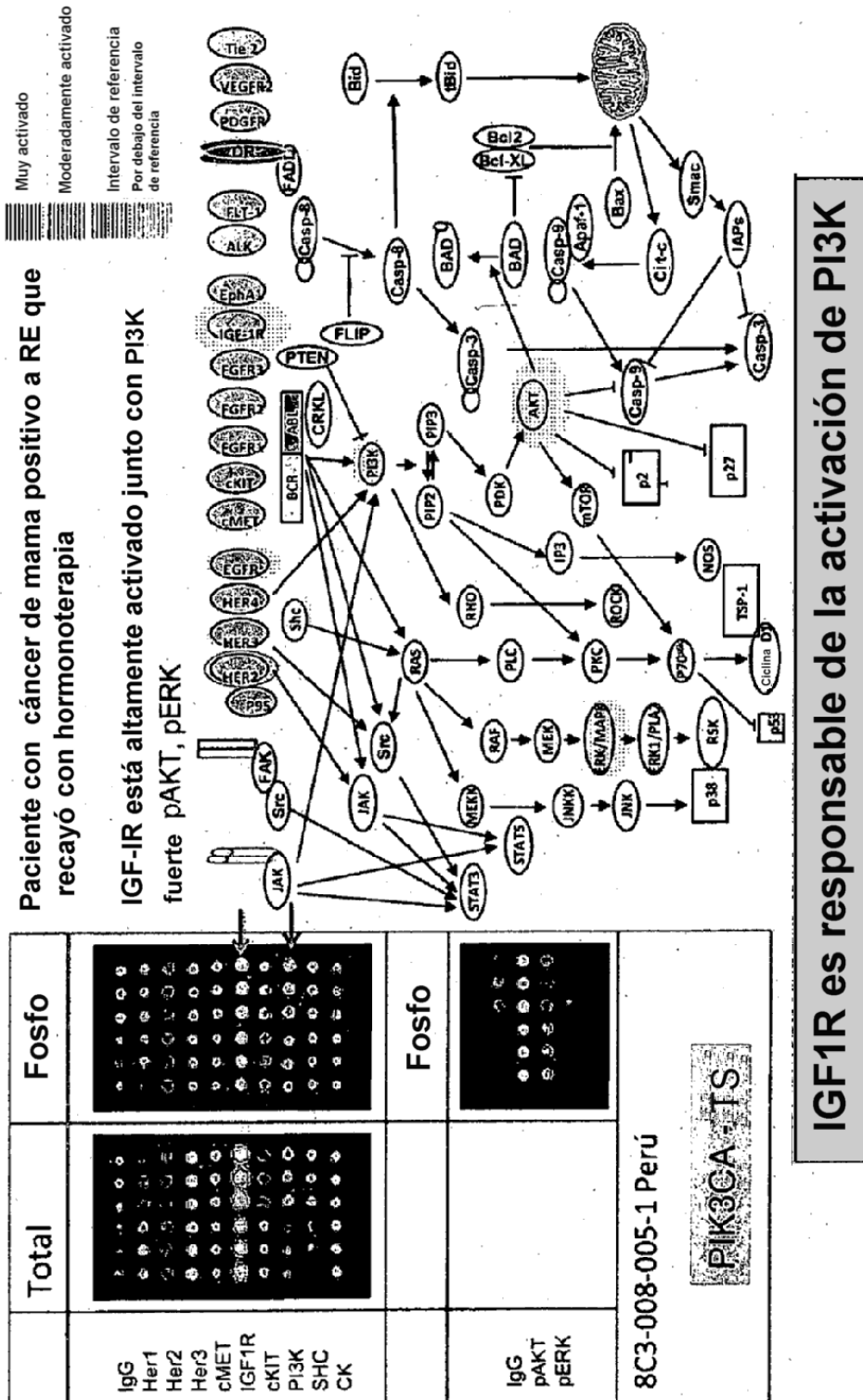


FIG. 25

Limite de IGF1R-T ≥ 30						
IGF1R-P	IGF1R- P↑AKT↑ ✓✓	IGF1R- P↑AKT↓ ✓x	IGF1R- P↓AKT↑ x✓	IGF1R- P↓AKT↓ xx	N.ºIGF1R-P + N.ºAKT +	N.º de muestras
Limite de AKT ≥ 16	15	2	26	17	17	60
Limite de AKT ≥ 8	16	1	29	14	17	60
Limite de AKT ≥ 4	17	0	34	9	17	60
						valor p
						0,0335
						0,0279
						0,0381

6

Limite de IGF1R-T ≥ 30						
IGF1R-T	IGF1R- T↑AKT↑ ✓✓	IGF1R- T↑AKT↓ ✓x	IGF1R- T↓AKT↑ x✓	IGF1R- T↓AKT↓ xx	N.ºIGF1R-P + N.ºAKT +	N.º de muestras
Limite de AKT ≥ 16	19	3	22	16	22	60
Limite de AKT ≥ 8	20	2	25	13	22	60
Limite de AKT ≥ 4	21	1	30	8	22	60
						valor p
						0,0203
						0,0278
						0,0838

FIG. 26

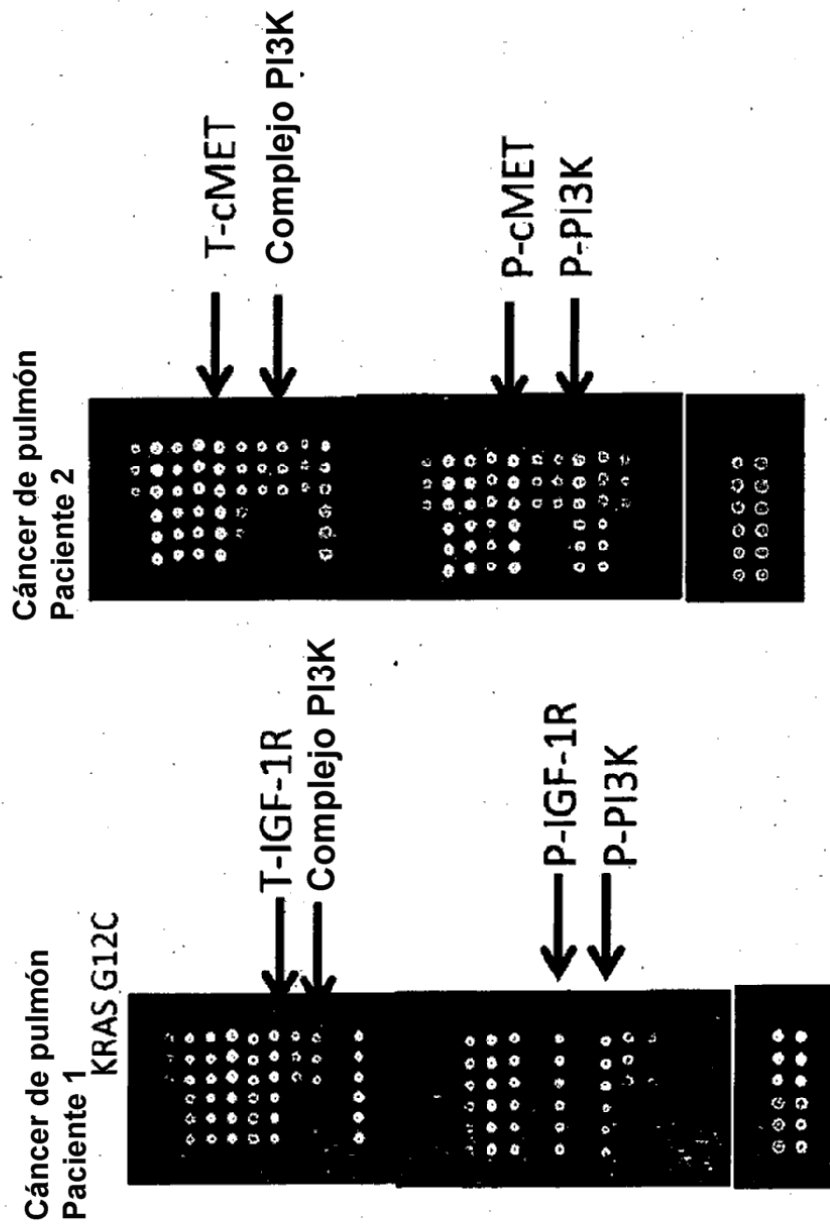
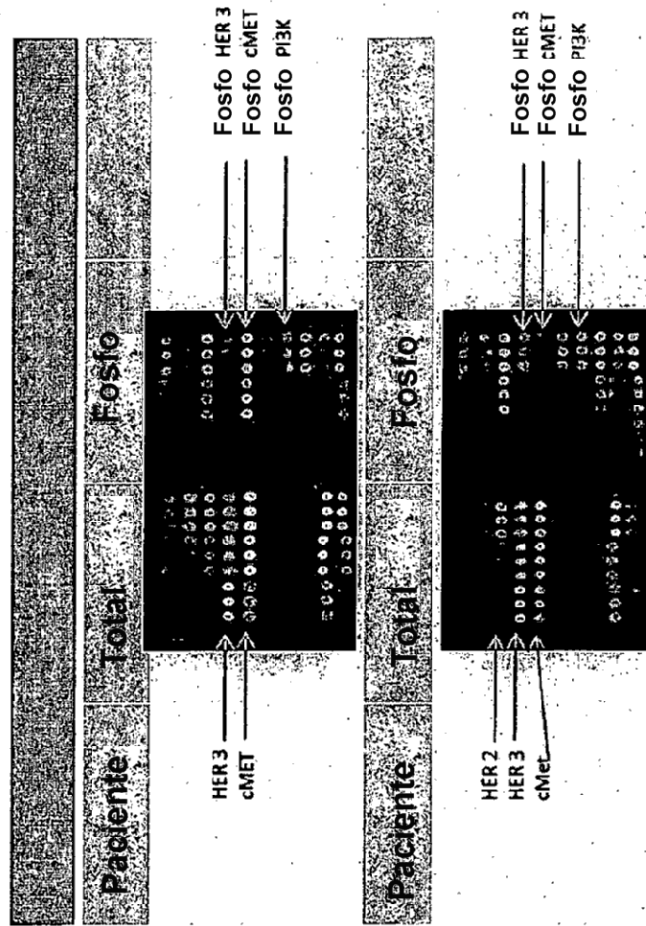


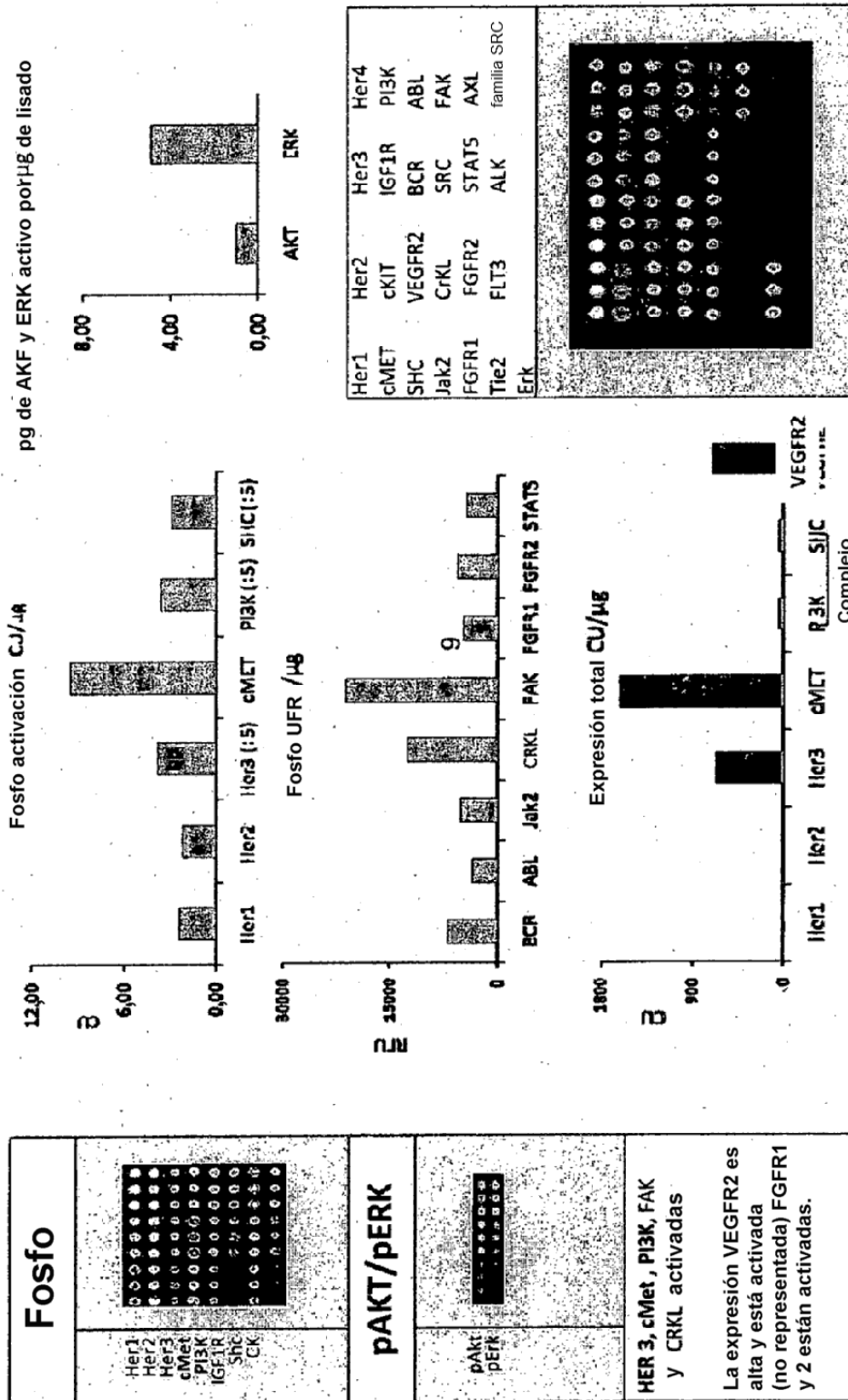
FIG. 27

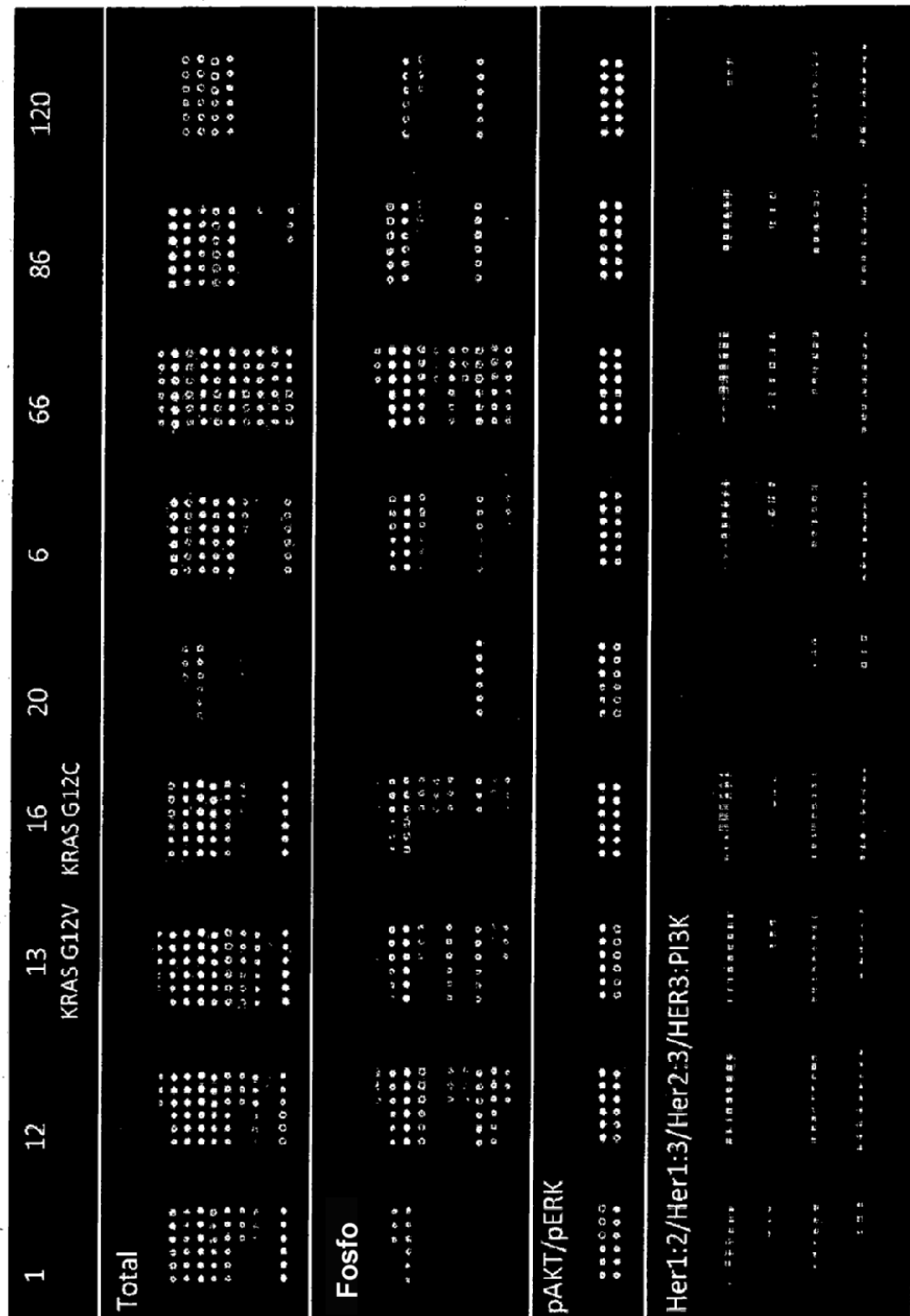
Muestras de pacientes asiáticos: Mutaciones KRAS: 8/29
 Pacientes de raza blanca: Mutaciones KRAS: 13/48



cMet es responsable de la activación de PI3K

FIG. 28





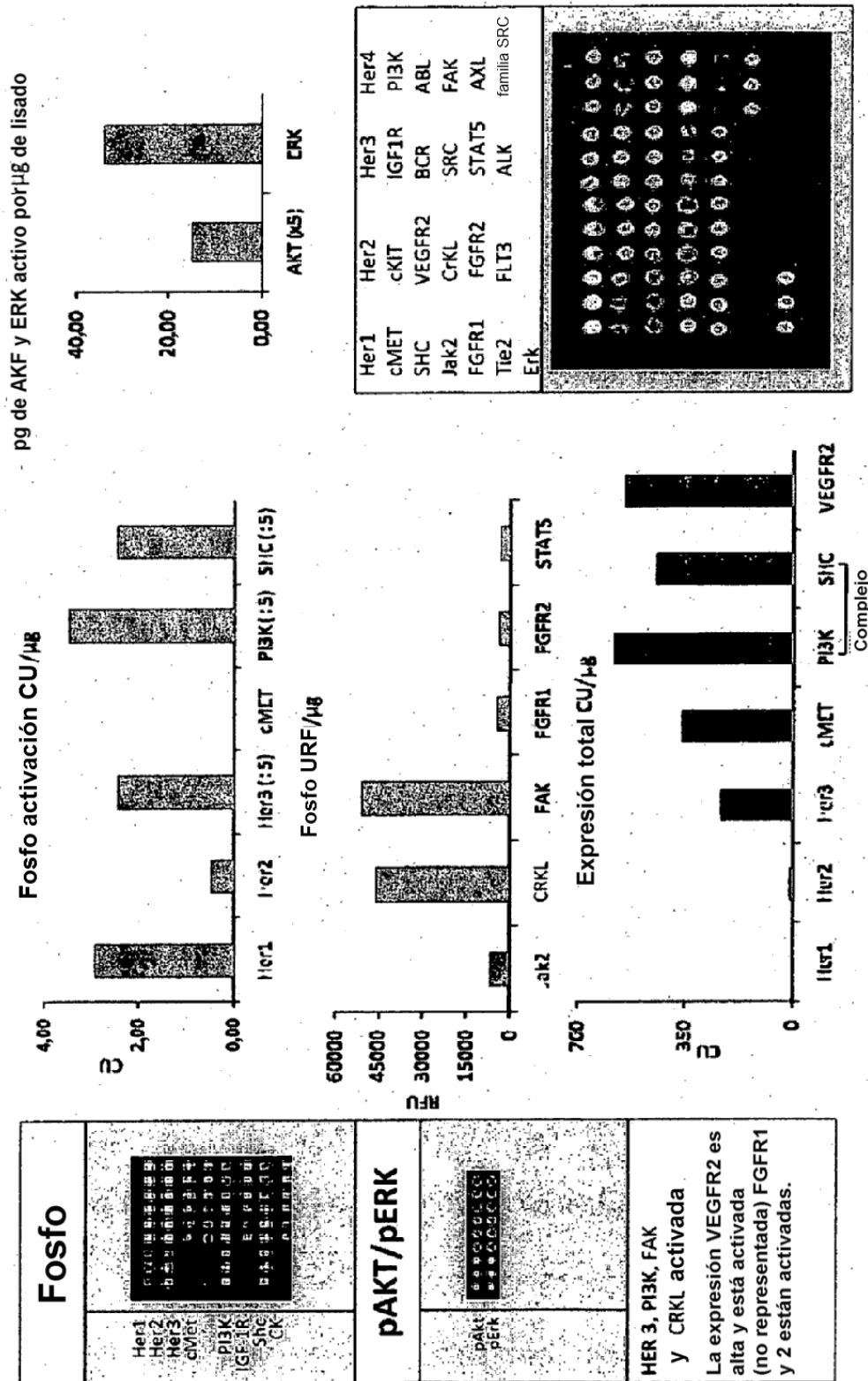


FIG. 31

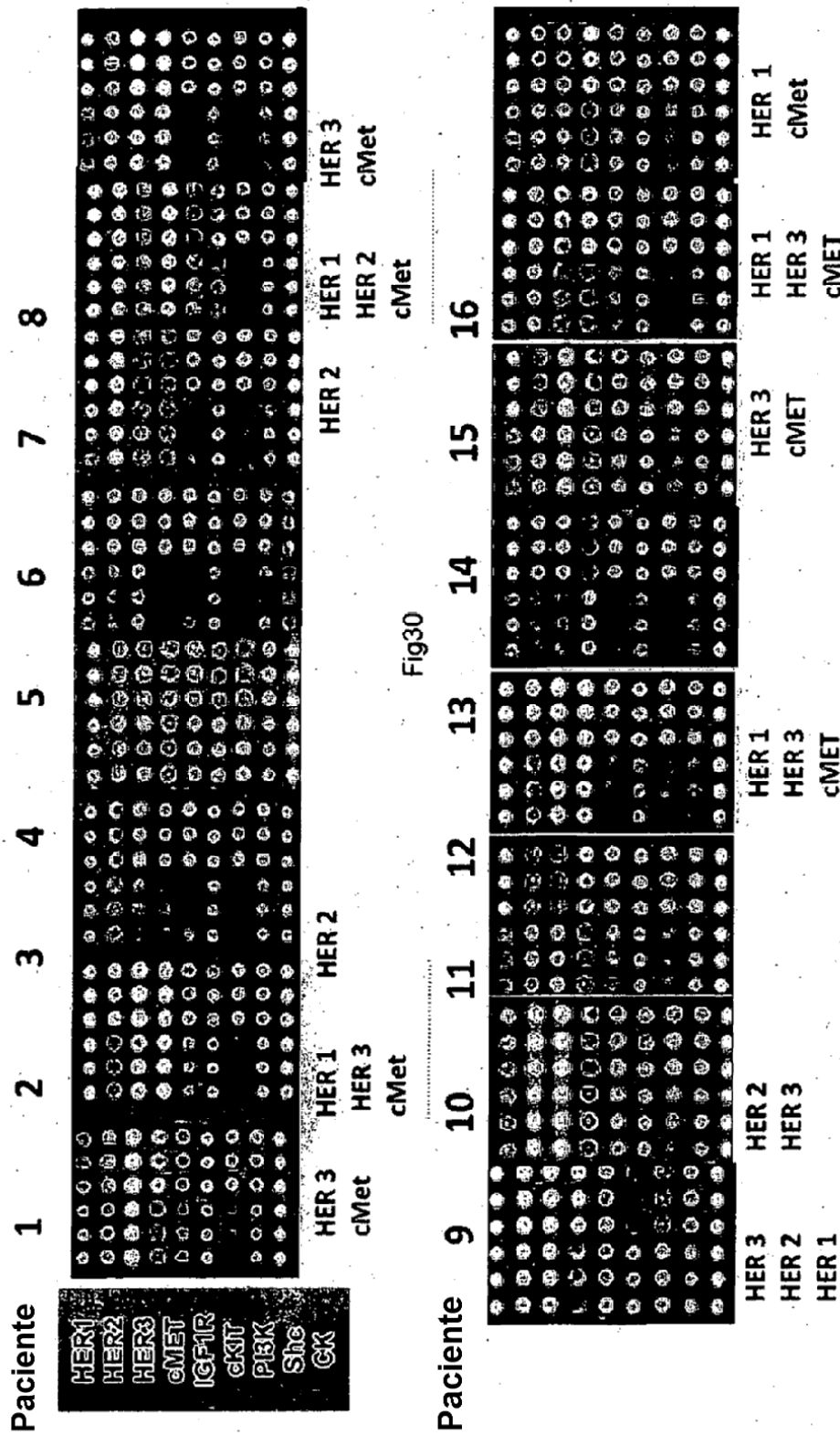
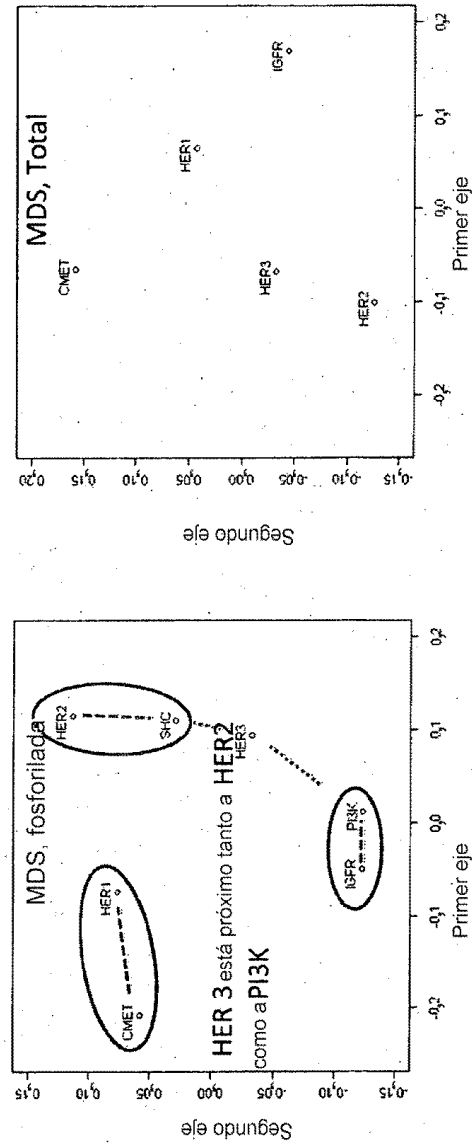
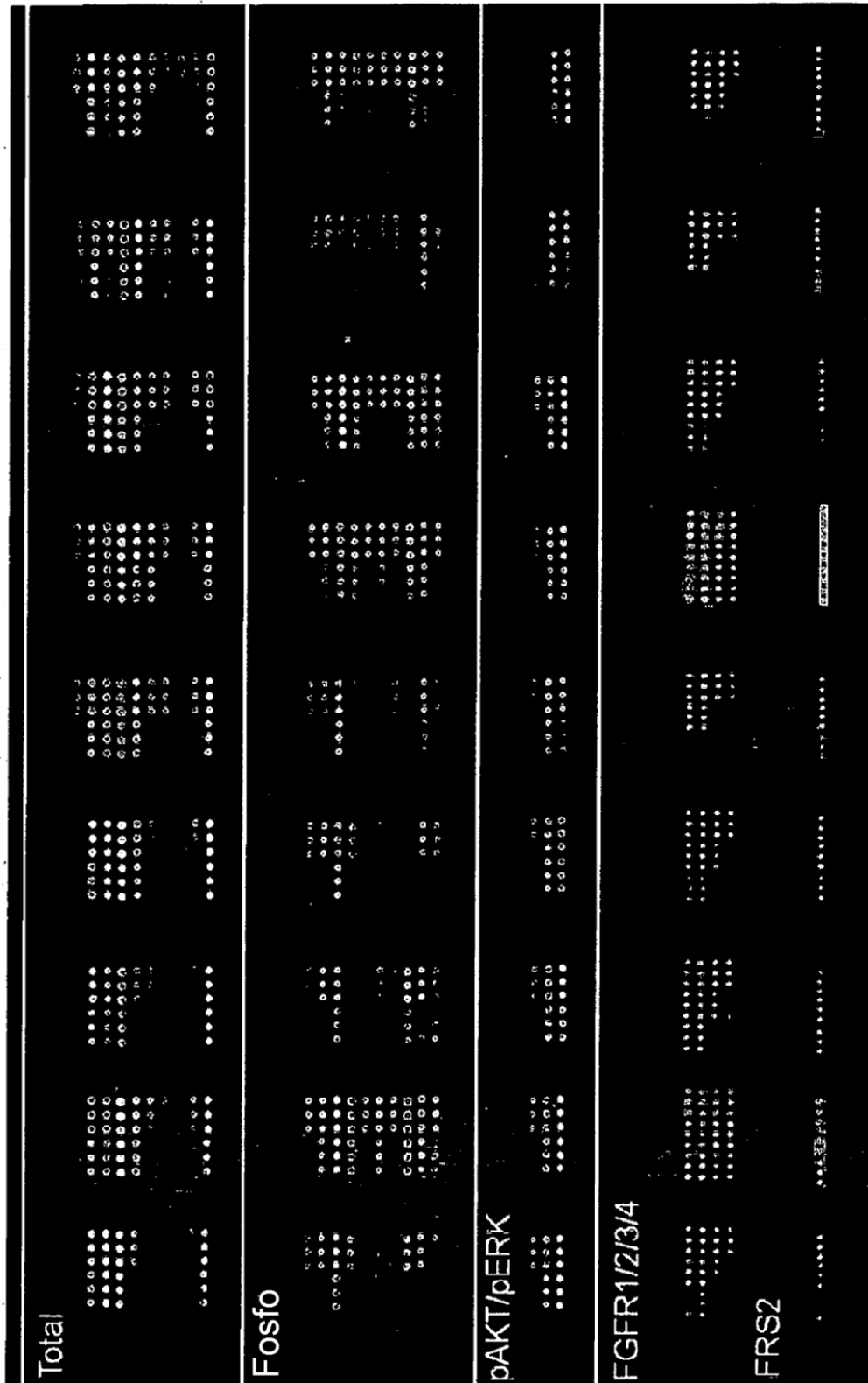


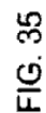
FIG. 32



- Gráfico usando EMD (escalado multidimensional, similar a análisis de componentes principales).
- Pacientes con cáncer gástrico: N=435x7 ensayos / 5 ensayos (P / T).
- Para cada marcador, se identifican muestras en MÁX 25 % como positivas.
- Para cualquiera de los dos marcadores, la "similitud" se mide por concordancia (es decir, superposición de positivos).
- El MDS presenta los marcadores en dos dimensiones de manera que trata de preservar las relaciones de distancia.
- Se usa concordancia (en lugar de correlación) debido a la falta de datos y a datos no cuantificables.

FIG. 33





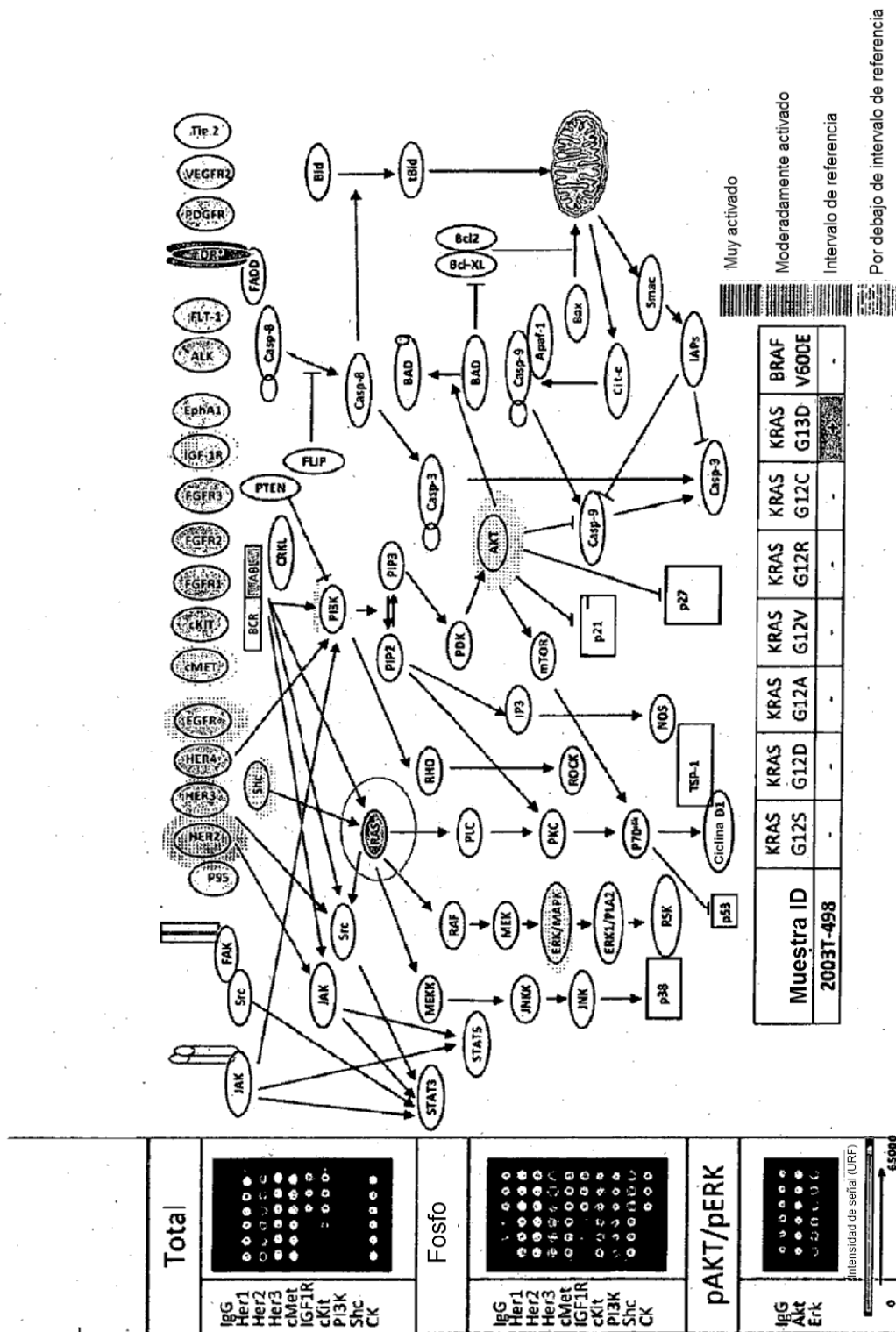
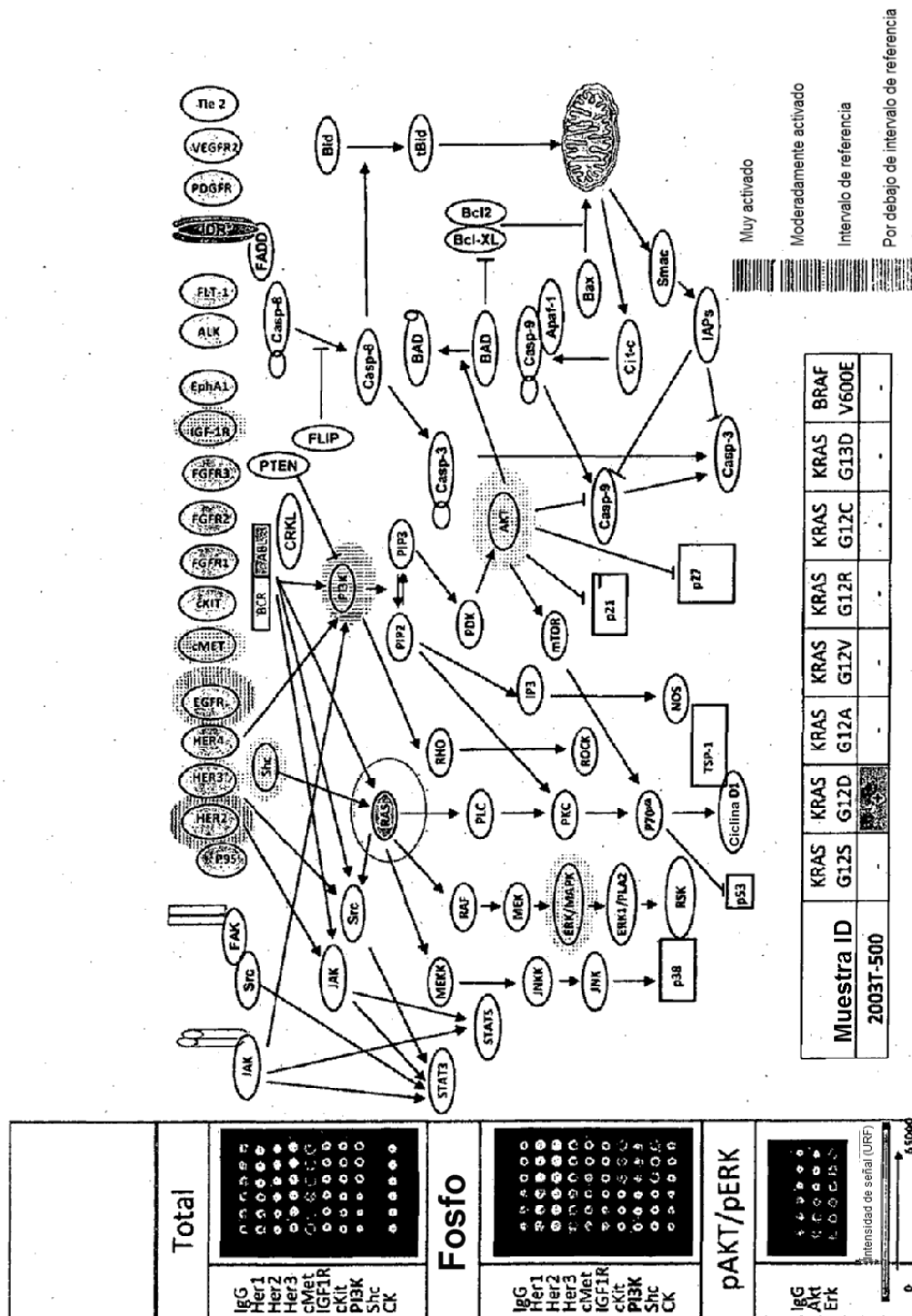


FIG. 36



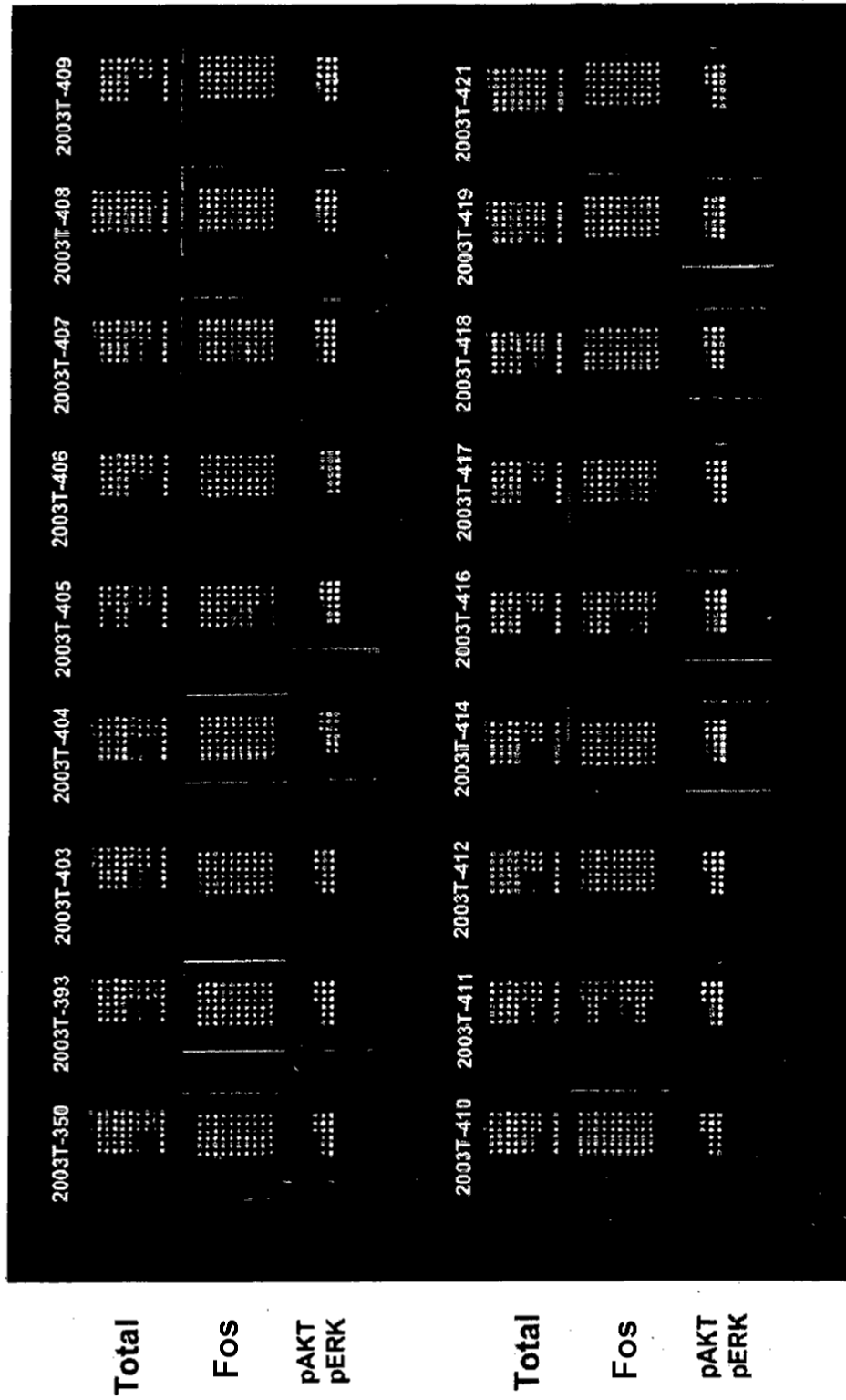


FIG. 38

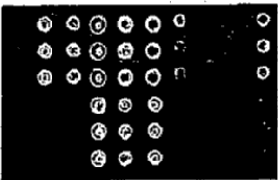
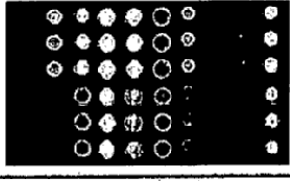
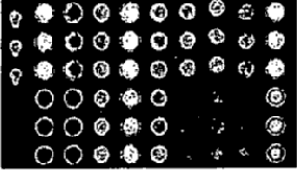
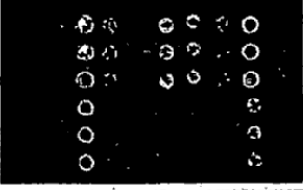
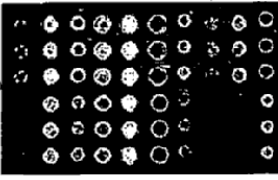
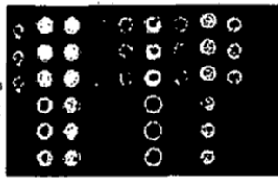
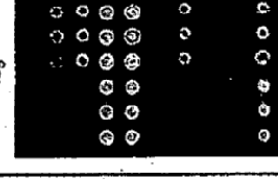
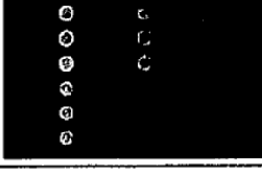
N.º 1	Total	Fosfo	N.º 1	Total	Fosfo	N.º 1	Total	Fosfo
IgG Her1 Her2 Her3 cMET IGF1R cKIT PI3K SHC CK			IgG Her1 Her2 Her3 cMET IGF1R cKIT PI3K SHC CK			IgG Her1 Her2 Her3 cMET IGF1R cKIT PI3K SHC CK		
N.º 2	Total	Fosfo	N.º 2	Total	Fosfo	N.º 2	Total	Fosfo
IgG Her1 Her2 Her3 cMET IGF1R cKIT PI3K SHC CK			IgG Her1 Her2 Her3 cMET IGF1R cKIT PI3K SHC CK			IgG Her1 Her2 Her3 cMET IGF1R cKIT PI3K SHC CK		
10C8-315-1508A KRAS G12V			10C8-315-1512A KRAS G12V			10C8-315-1504A KRAS G12D		

FIG. 39

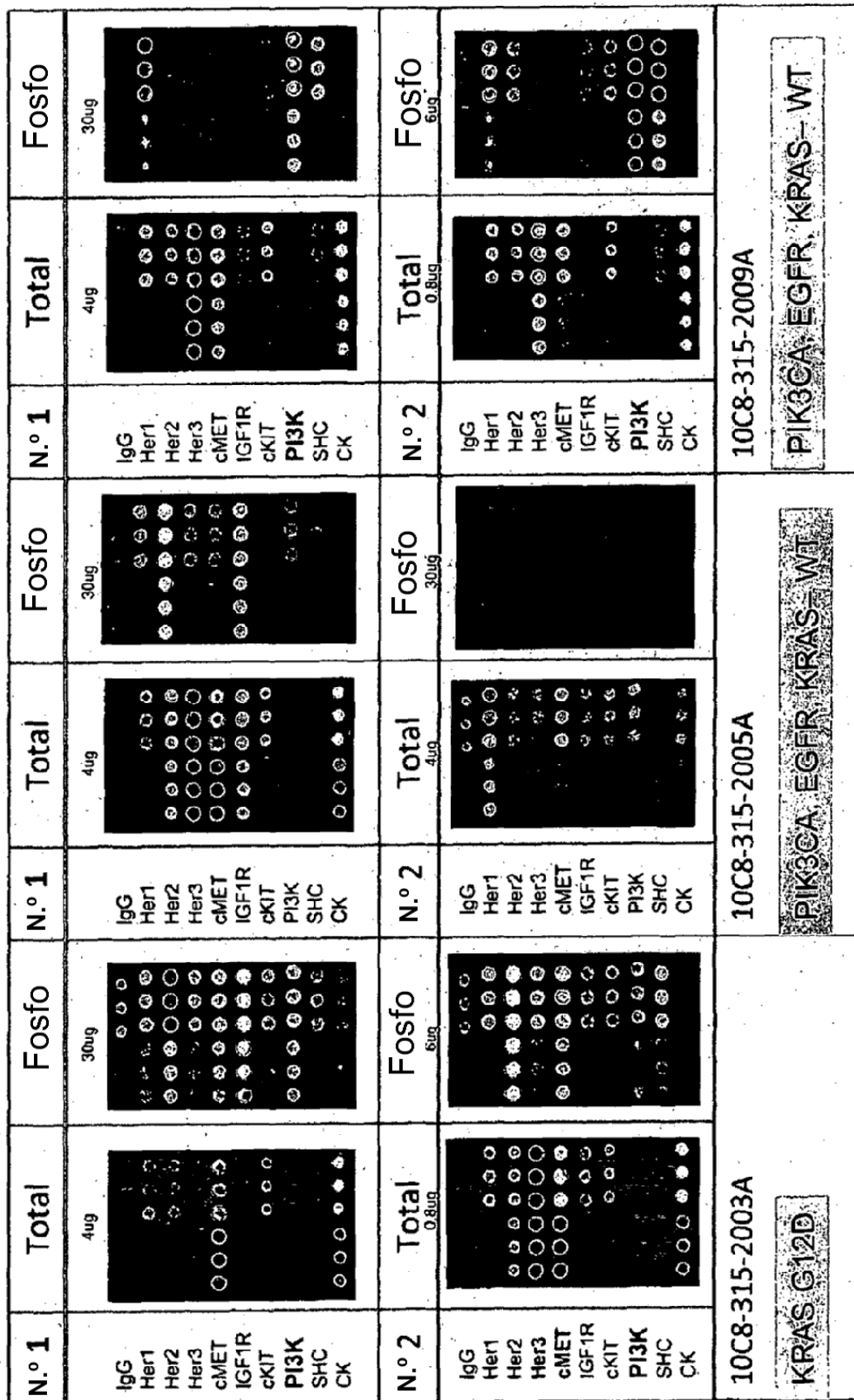
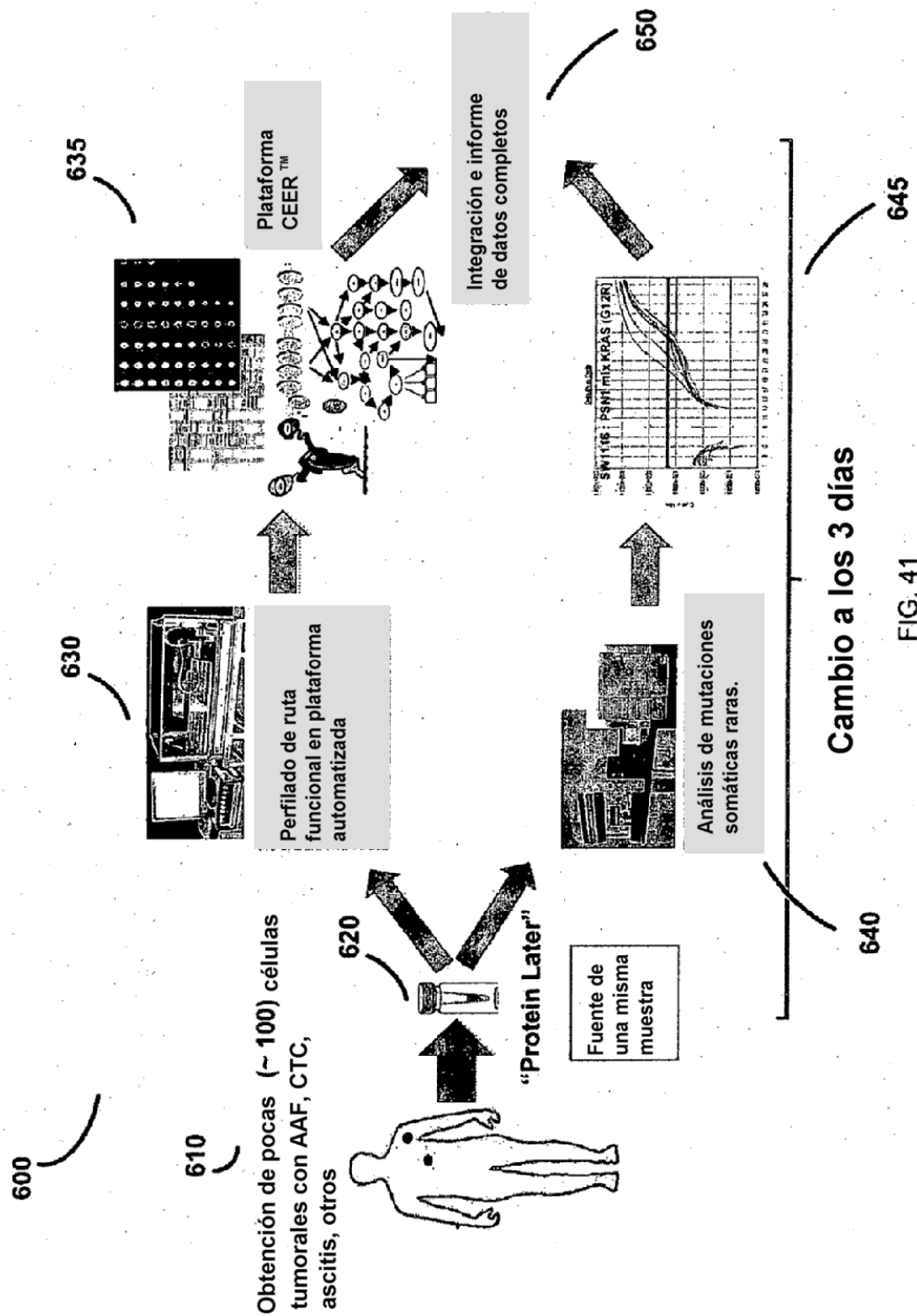
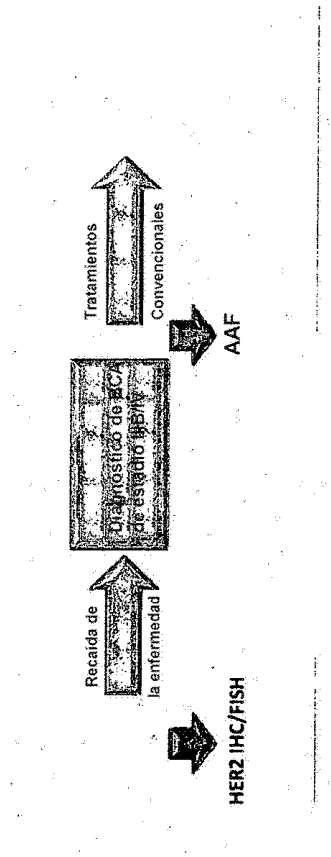


FIG. 40





- Estudio multifuncional / multicéntrico
- Participan 124 pacientes (PTS) con cancer de mama en estadio IIIB y IV
- AAF recogido de diversos sitios metastásicos de cada paciente (sitios múltiples si possible)
 - Sitios de metástasis:
 - hígado, hueso, ganglios linfáticos axilares y otros, pulmón, piel, pared torácica, cerebro, masa esternal
- AAF recogido en 100 ml de un "Protein Later" con aguja de calibre 23 o USE-AAF
 - FNA stored and shipped at ambient temperature
- Se realizó análisis intermedio en 58 pacientes para proteínas de rutas múltiples

FIG. 42

- En Protein Later-AAF de análisis de complejos múltiples estaban presentes suficientes materiales
- 58 de 58 (100 %): 4 a 8 μ l (de los $\sim$ 100 μ l) de lisado de AAF fue suficiente para realizar el perfil de RTK y proteínas de señal aguas abajo (* tasa de acierto mucho mayor de $\sim$ 70 % para análisis basado en ARN)
- Las proteínas se preservaron bien para el perfilado + genotipado de la ruta funcional
- Se observaron fuertes patrones de expresión de la ruta
- Los sitios fosforilados se preservaron bien para análisis funcional
- [Es posible realizar el perfil de una fuente de una sola muestra tanto para la mutación como para la ruta!]

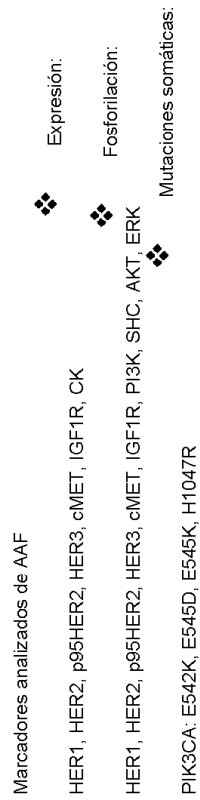


FIG. 43

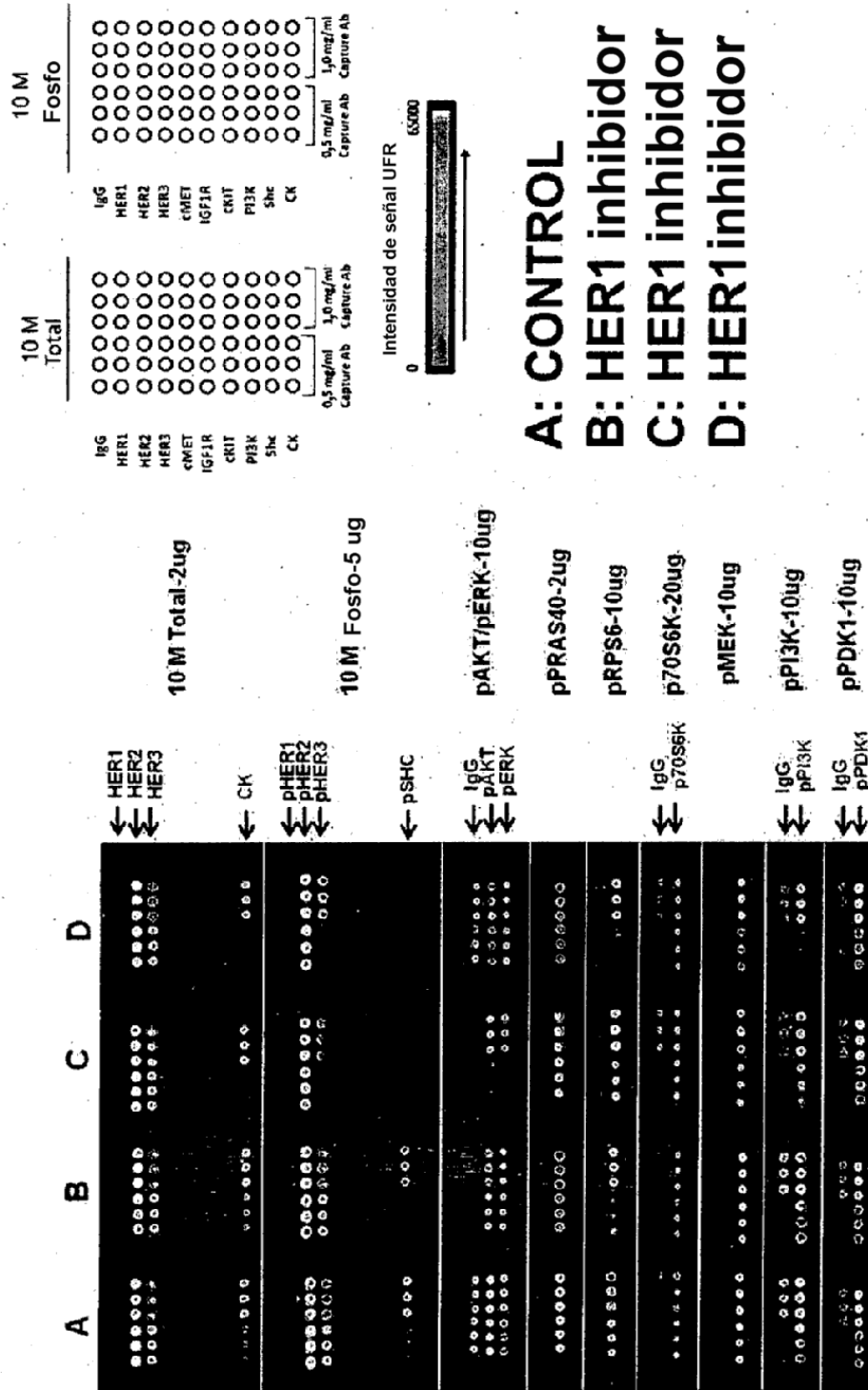
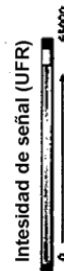
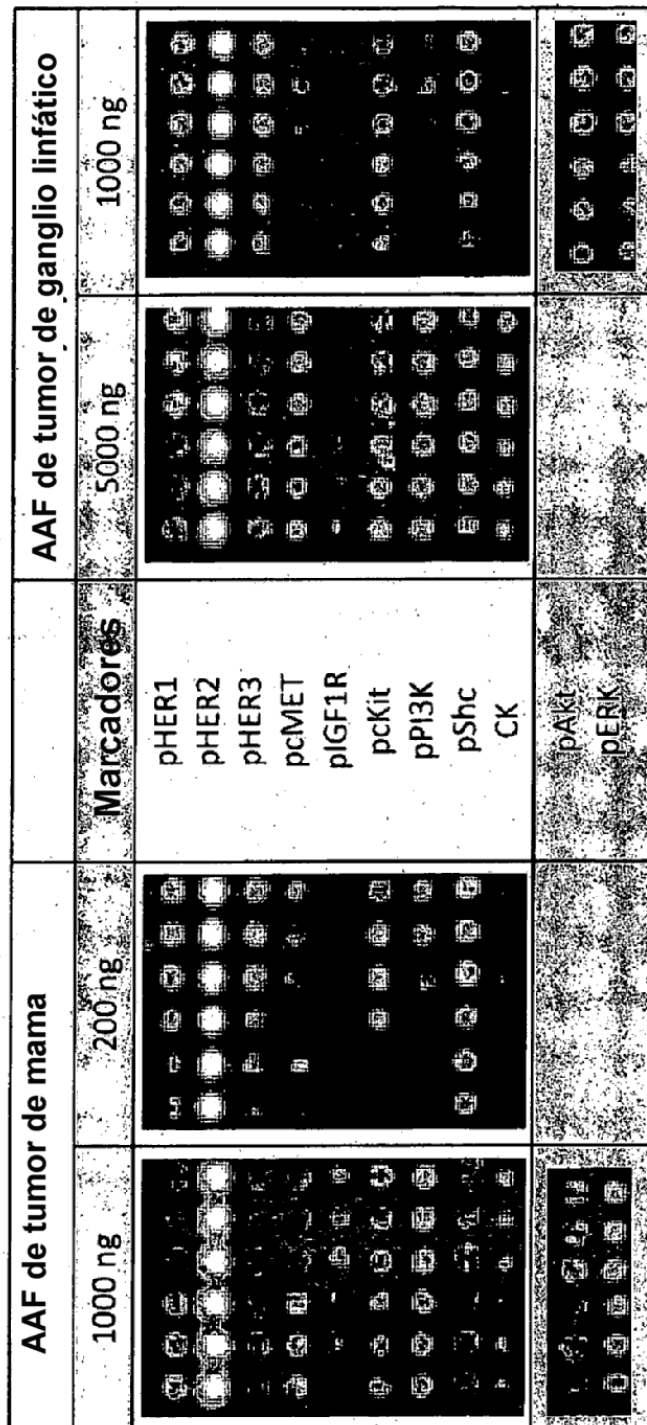


FIG. 44



Se obtuvieron muestras de AAF usando una aguja de calibre 23 o 25 de GL o de región axilar y

USE-AAF/Núcleos → Datos completos de cantidades de muestra mínimas

FIG. 45

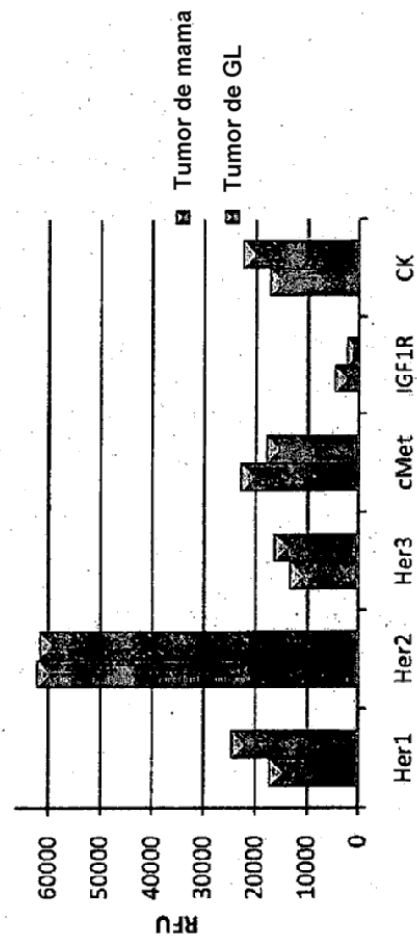
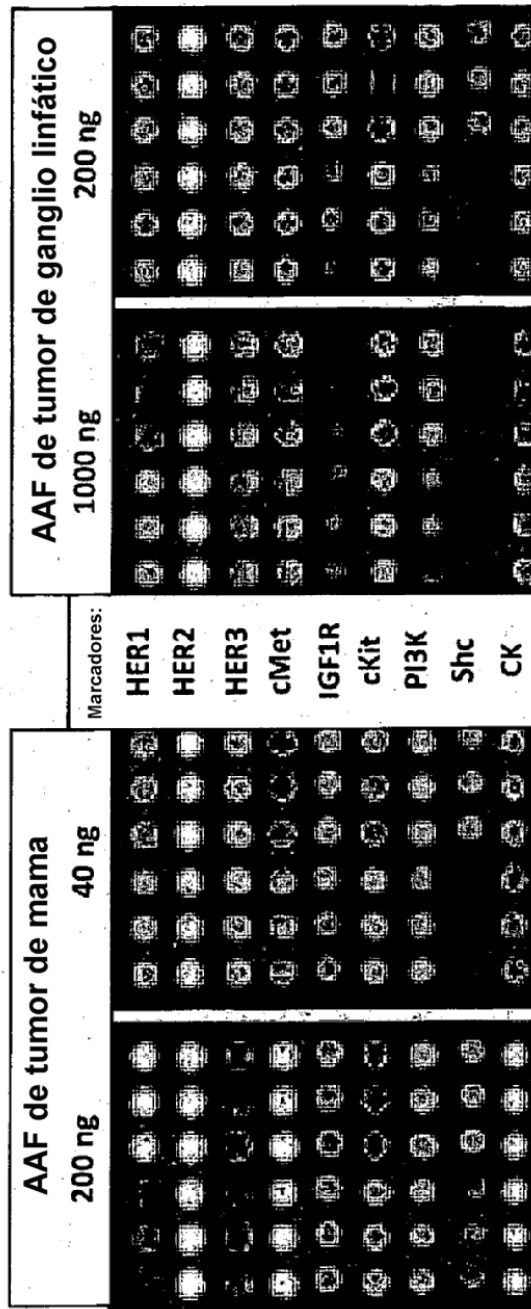


FIG. 46

Marcedor 1	Marcedor 2	valor p	% de pacientes
P-HER 2 en HER 2 sobreexpresada (+3) pacientes	P-AKT	0,0031	23%
P-HER 2 en HER 2 Sobreexpresada (+3) Pacientes	PI3K activada	0,0011	20%
PI3K activada (mutante)	P-AKT	0,022	32%
P-HER 2 en HER 2 (+1 y +2) pacientes	PI3K activada	0,00023	18%
P-HER 2 in HER 2 (+1 y +2) pacientes	P-AKT	0,019	22%
P-HER3	P-AKT	0,00007	37%
P-HER3	PI3K activada	0,0012	20%

FIG. 47

Paciente 14003-3004

Resumen de resultados del ensayo del paciente										
	Activación				Expresión					
	HER1	HER2	HER3	cMET	PI3K	AKT	ERK	RPS6	HER1	Baja
									HER2	Alta
									HER3	Alta
									cMET	Moderada
									PTEN	Positiva
									PIK3CA	NO
								BRAF	NO	
HER1-P	HER2-P	HER3-P	cMET-P	PI3K	AKT-P	ERK-P	RPS6-P			
12,9	135,7	391,8	L	60,2	Presente	Presente	Presente			
1.290.867	13.569.590	2.742.578								
HER1-T	HER2-T	HER3-T	cMET-T	CK						
55,3	169,3	698,5	137,1	284,3						
27.633.071	169.296.016	6.984.590	54.839.345							
UC										
N.º de pRTK										

FIG. 48

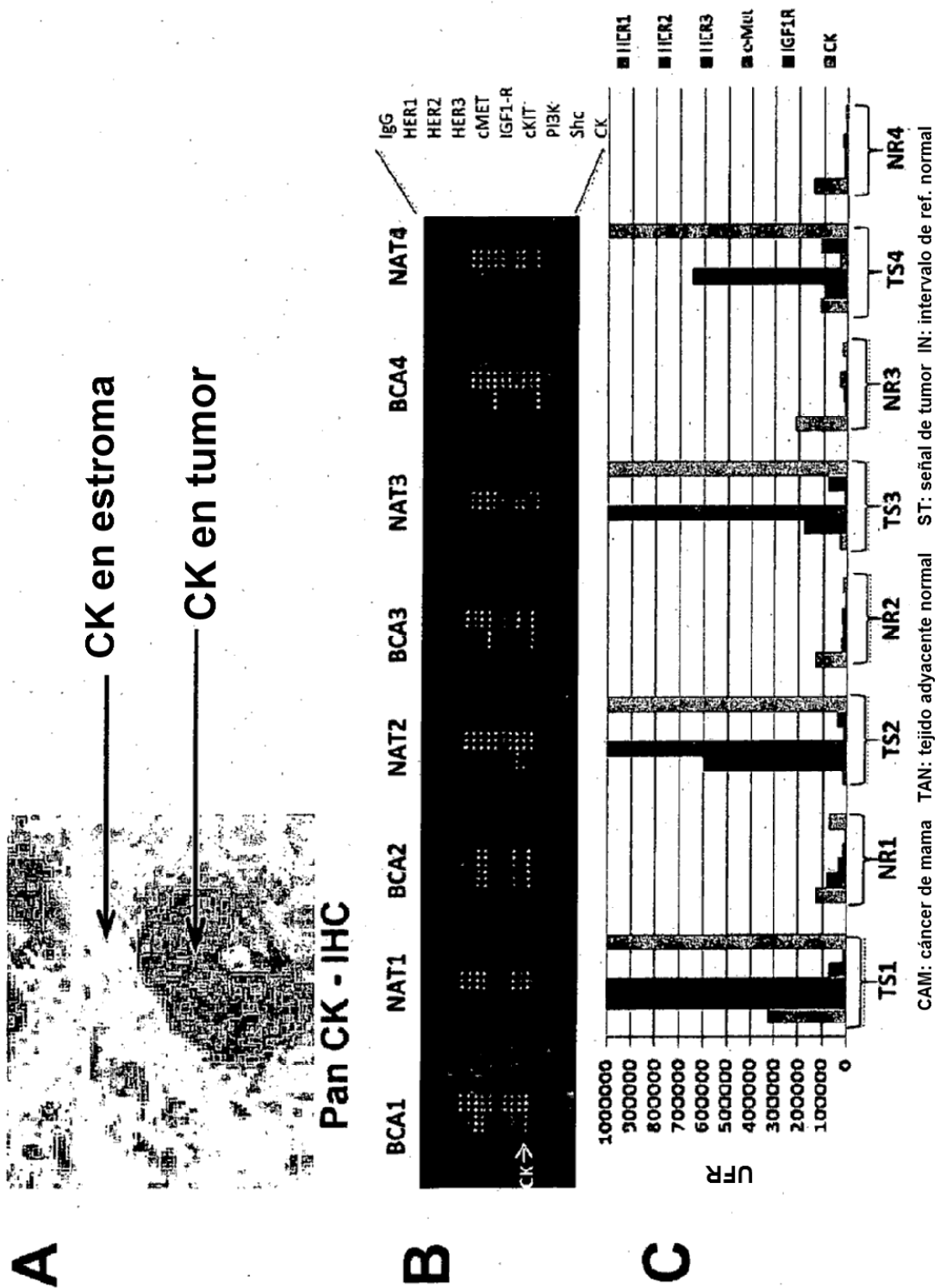


FIG. 49



B

HER2-IHC	3+	2+	1+/0
muestra n.º	31	19	24
Total p95HER2 +	17 (55%)	2 (11%)	0
Fosfo p95HER2 +	10 (32%)	2 (11%)	0

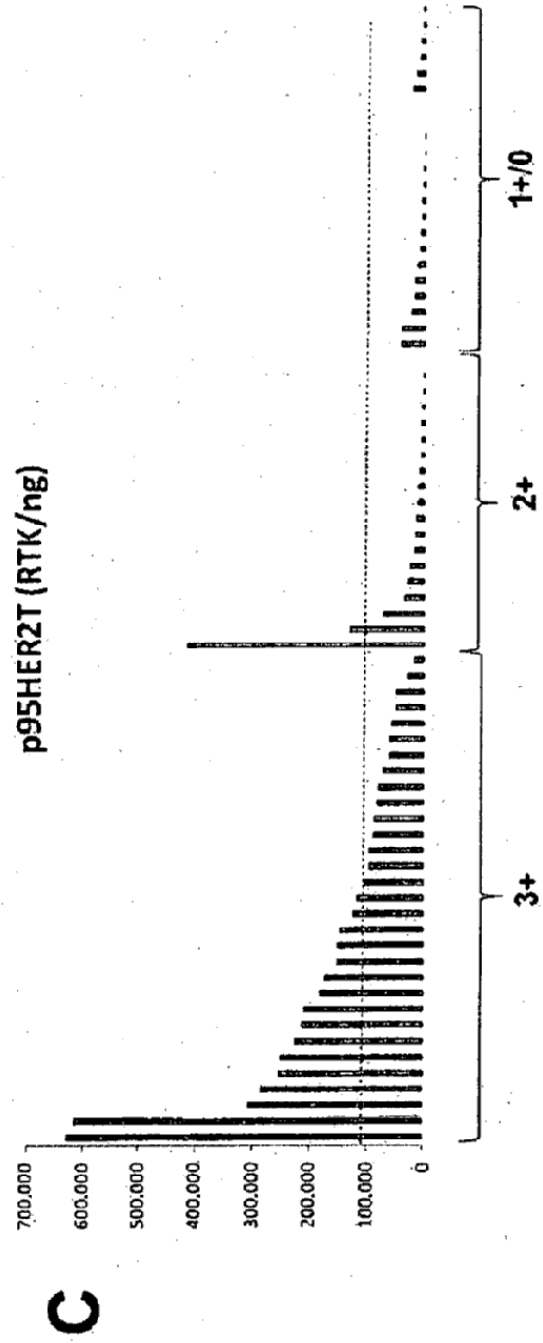


FIG. 50

	Positivo (+3)	Negativo (+2/+1/0)	* Información de IHC primaria disponible para el análisis final
IHC (N)	6	21	27
CEER +	6	2	7
% de concordancia	100%	90,5%	
% de conversión		9,5%	

- **Análisis intermedio en 58 muestras de AFF realizadas con CEER**
- **100 % de concordancia para muestras IHC HER2 positivas con CEER**
- **90,5 % de concordancia para tumores IHC HER2 negativos con CEER**
- **8 especímenes tenían mutaciones PI3K (PIK3CA)**

FIG. 51

☐ En Protein Later-AAF de análisis de complejos múltiples estaban presentes suficientes materiales.

☐ 58 de 58 (100 %): 4 a 8 µl (de los ~ 100 µl) de lisado de AAF fue suficiente para realizar el perfil de RTK y proteínas de señal aguas abajo (* tasa de acierto mucho mayor de ~ 70 % para análisis basado en ARN)

☐ Las proteínas se preservaron bien para el perfilado + genotipado de la ruta funcional

☐ Se observaron fuertes patrones de expresión de la ruta

☐ Los sitios fosforilados se preservaron bien para análisis funcional

☐ Marcadores analizados de AAF

❖ Expresión:

☐ HER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF1R, CK

❖ Fosforilación:

☐ DHER1, HER2, p95HER2, HER3, cMET, IGF1R, PI3K, SHC, AKT, ERK

❖ Mutaciones somáticas

☐ PIK3CA/KRAS/BRAF

Muestra_Nombre	T_Her1	T_Her2	T_Her3	T_cMET	T_IGF1R	T_CK	P_Her1	P_Her2	P_Her3	P_cMET	P_IGF1R	P_PIK3
8C3-002-001A												
8C3-004-001A												
8C3-004-001A												
8C3-001-003A												
8C3-011-002A-2												
8C3-011-002A-1												
8C3-011-001A												
8C3-010-003A												
8C3-010-002A												
8C3-010-001A												
8C3-009-003A												
8C3-009-002A												
8C3-009-019A												
8C3-009-016A												
8C3-009-011A												
8C3-009-009A												
8C3-009-001A												
8C3-009-003A												
8C3-009-007A												
8C3-008-009A												
8C3-008-008A												
8C3-008-007A												
8C3-008-003A												
8C3-008-004A												
8C3-008-003A												
8C3-008-002A												
8C3-008-001A												
8C3-008-001A												
8C3-007-003A												
8C3-007-001A												
8C3-006-010A												
8C3-006-009AW												
8C3-006-008A												
8C3-006-007A												
8C3-006-006A												
8C3-006-005A												
8C3-006-004A												
8C3-006-003A												
8C3-006-001A												

Baja Alta

FIG. 52

Fosfo

CK

Total