

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 019**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2006 E 06737407 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2013 EP 1856292**

54 Título: **Métodos de diagnóstico para identificar pacientes candidatos para el tratamiento con trastuzumab**

30 Prioridad:

**09.03.2005 US 659961 P**

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

**31.01.2014**

73 Titular/es:

**ABBOTT LABORATORIES (50.0%)  
1300 E. Touhy Avenue  
Des Plaines IL 60018, US y  
RUSH-PRESBYTERIAN-ST.LUKE'S MEDICAL  
CENTER (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MORRISON, LARRY E.;  
JEWELL, SUSAN S. y  
COON, JOHN S.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 441 019 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de diagnóstico para identificar pacientes candidatos para el tratamiento con trastuzumab

5 **Antecedentes de la invención**

10 El cáncer de mama es el tumor maligno entre mujeres más común en la mayoría de los países industrializados, ya que se estima que afecta aproximadamente al 10% de la población femenina durante su vida. Aunque su mortalidad no ha aumentado igual que su incidencia, debido a su precoz diagnóstico y tratamiento mejorado, todavía es una de las causas predominantes de muerte en mujeres de mediana edad.

15 El tratamiento principal para el cáncer de mama es la cirugía, o bien sola o bien combinada con una terapia coadyuvante sistémica (hormonal o citotóxica) y/o radiación postoperatoria. La mayoría de los pacientes se curan con estos tratamientos, pero aproximadamente el 25-30 % de las mujeres con la enfermedad con un resultado negativo en ganglios y al menos el 50-60 % de las mujeres con un resultado positivo en ganglios, que parecen haberse liberado de la enfermedad después del tratamiento locoregional, recaerán y necesitarán tratamiento para su enfermedad metastásica. De esta manera, el cáncer de mama metastásico es un problema significativo y creciente en oncología.

20 Aproximadamente del 30 al 40 % de las mujeres con cáncer de mama operable desarrollan con el tiempo metástasis distantes. Comúnmente, el cáncer de mama metastásico se trata con antraciclinas, tales como doxorubicina y epirubicina, que actúan mediante inhibición de la enzima topoisomerasa II (TOP2A) en células cancerosas. Una respuesta favorable a la quimioterapia basada en el inhibidor de TOP2A mejora la supervivencia después de la quimioterapia y tiene un efecto positivo sobre la calidad de vida.

25 La respuesta de los pacientes a los inhibidores de topoisomerasa II varía ampliamente. Además, solo del 5 al 10 % de los pacientes con cáncer de mama con enfermedad claramente metastásica consiguen la remisión clínica completa. En el 30 al 50 % de tales casos, la respuesta es parcial y la duración de la respuesta varía típicamente de 6 a 24 meses. En los pacientes restantes, no se detecta ninguna respuesta objetiva o la enfermedad progresa a pesar del tratamiento en curso.

30 La sobreexpresión de la proteína receptora *HER-2* (ERBB2) se ha asociado desde hace tiempo con cáncer de mama más agresivo y se produce principalmente como resultado de la amplificación del gen *HER-2/neu*, también denominado ERBB2 o más simplemente *HER-2*. De manera más importante, la amplificación de *HER-2* es un indicador establecido de respuesta tumoral al anticuerpo anti-ERBB2 humanizado trastuzumab (vendido en el mercado como Herceptin® por Genentech). Sin embargo, los carcinomas de mama que carecen de la amplificación de *HER-2* rara vez responden al trastuzumab, mientras que tienen buena respuesta el 20-40 % de los tumores con amplificación de *HER-2*. Además, el trastuzumab tiene efectos secundarios cardiotoxicos y es caro. De esta manera, existe la necesidad de métodos que identifiquen los tumores que pueden tratarse más satisfactoriamente con trastuzumab. Tales métodos permitirán a los médicos una mejor asociación de la terapia con trastuzumab con pacientes con más probabilidad de beneficiarse de tal terapia; evitando de esta manera la prescripción de la terapia con trastuzumab para pacientes con poca probabilidad de beneficiarse de trastuzumab y evitando adicionalmente la morbilidad asociada de los pacientes y el coste de dicha terapia.

45 Se ha sugerido que los candidatos para tratamiento eficaz con inhibidores de TOP2A pueden identificarse detectando los números de copias para *HER-2/neu* y TOP2A. Documento U.S. 2003/0134279A1 de Isola, et al. Se dice que los pacientes que indican amplificación de *HER-2/neu* y TOP2A son buenos candidatos para tratamiento con inhibidores de TOP2A.

50 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona métodos para identificar pacientes de cáncer susceptibles al tratamiento eficaz con trastuzumab y otros medicamentos que funcionan de manera similar al trastuzumab. Se cree que el trastuzumab actúa, en parte, al inhibir la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2*. De esta manera, la invención proporciona métodos para determinar la susceptibilidad de los pacientes de cáncer a tratamientos satisfactorios con una medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2*. La invención se basa en el descubrimiento de que ciertas anomalías cromosómicas pueden usarse para identificar selectivamente pacientes de cáncer que probablemente puedan tratarse satisfactoriamente con medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2* o que, de otro modo, funciona de forma similar al trastuzumab. La invención se basa en el uso de la tecnología de ácidos nucleicos donde se dejan hibridar sondas de ácido nucleico con muestras celulares y se cuantifica el número de copias de regiones genéticas particulares. Preferentemente se usa la hibridación *in situ* y, más preferentemente, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) con sondas de ácido nucleico marcadas con fluorescencia. Después, los resultados de la hibridación se usan para determinar la probabilidad de tratar al paciente satisfactoriamente con una medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2*. Preferentemente, las muestras celulares son muestras de células mamarias y la medicación es trastuzumab o una medicación que funcione de manera similar al trastuzumab.

El método para identificar pacientes candidatos para el tratamiento con medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2* se indica en la reivindicación 1. Un método adicional para identificar un paciente candidato para el tratamiento con trastuzumab se indica en la reivindicación 10. Es posible que el paciente candidato sea un paciente del que se sospecha que tiene tener células cancerosas. Al paciente candidato también  
 5 puede haberse diagnosticado previamente la presencia de células cancerosas procedentes de enfermedades que incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, osteosarcoma, cáncer gástrico, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer epitelial ovárico y otros cánceres. Preferentemente, el paciente candidato tiene cáncer de mama. En realizaciones particularmente preferentes, el paciente candidato tiene células cancerosas de mama metastásicas.

10 La demostración comprende la comparación del número de copias de *HER-2/neu* y uno o más de los otros marcadores como se indica en las reivindicaciones 1 y 10 en una o más sondas de referencia adecuadas. Por ejemplo, el número de copias del cromosoma 17 medido por una sonda peri-centromérica para el cromosoma 17 puede usarse como referencia para Her2 y/o TOP2A.

15 Los métodos de la invención pueden realizarse en una muestra de tejido (por ejemplo, una biopsia) que comprende las células del paciente candidato. En una realización, las células son células de cáncer de mama y el método comprende adicionalmente el contacto de la muestra de tejido que comprende las células de cáncer de mama con sondas específicas para *HER-2/neu* y TOP2A. Las sondas están dimensionadas de tal manera que no se superpongan en su hibridación con las células de las muestras.

20 La presente invención también proporciona kits y conjuntos de sondas para usar en el diagnóstico de cánceres y, preferentemente, en métodos para determinar la susceptibilidad de pacientes sospechosos de tener cáncer al tratamiento satisfactorio con una medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2*. Preferentemente, en los conjuntos de sondas y kits de la invención se usan e incluyen sondas marcadas de manera  
 25 fluorescente. Los kits y conjuntos de sondas de la invención se indican en las reivindicaciones 12 y 16, respectivamente. Los kits y conjuntos de sondas comprenden una o más sondas de referencia adecuadas tales como una sonda capaz de enumerar el cromosoma 17. Los kits de la invención también pueden incluir reactivos adicionales para realizar los métodos de la invención.

### 30 Descripción detallada de la invención

La invención incluye métodos para identificar pacientes candidatos para el tratamiento con medicación que se cree que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora Her2 y conjuntos de sondas y kits para identificar los  
 35 pacientes candidatos. Preferentemente, los pacientes son pacientes con cáncer de mama y la medicación es trastuzumab.

**Sondas cromosómicas.** Las sondas adecuadas para usar en los métodos de hibridación *in situ* utilizados con la invención se clasifican en dos grupos amplios: sondas de enumeración cromosómicas, es decir, sondas que hibridan con una región cromosómica, usualmente una región de secuencia de repetición, e indican la presencia o ausencia de  
 40 un cromosoma completo; y sondas específicas de locus, es decir, sondas que hibridan con un locus específico en un cromosoma y detectan la presencia o ausencia de un locus específico. También pueden ser útiles las sondas de brazo de cromosoma, es decir, sondas que hibridan con una región cromosómica e indican la presencia o ausencia de un brazo de un cromosoma específico. Las sondas cromosómicas y las combinaciones de las mismas se eligen por la capacidad de clasificar a los pacientes en función de la respuesta a la terapia cuando se usan en métodos de la invención. La respuesta a la terapia se clasifica comúnmente como enfermedad progresiva (EP), enfermedad estable  
 45 (EE), respuesta parcial (RP) y respuesta completa (RC). Típicamente, se considera que una buena respuesta incluye RP + RC (denominado colectivamente en el presente documento Respuesta Objetiva), pero también puede ampliarse para incluir EE (denominado en el presente documento Beneficio Clínico), particularmente cuando la enfermedad es severa. Los conjuntos de sondas pueden comprender cualquier número de sondas, por ejemplo 2, 3, 4 o más sondas.  
 50 El número de sondas útiles con la invención se limita solo por la capacidad del usuario para detectar las sondas en una base individual.

Como es bien conocido en la técnica, una sonda de enumeración cromosómica puede hibridar con una secuencia repetitiva, localizada o cerca o retirada de un centrómero, o puede hibridar con una secuencia única localizada en  
 55 cualquier posición en un cromosoma. Por ejemplo, una sonda de enumeración cromosómica puede hibridar con un ADN repetitivo asociado con el centrómero de un cromosoma. Los centrómeros de los cromosomas de primates contienen una familia compleja de repeticiones en tándem largas de ADN compuestas de una repetición de monómero con una longitud de aproximadamente 171 pares de bases, que se denominan ADN alfa-satélite. Son ejemplos no limitantes de sondas de enumeración cromosómica específicas las sondas peri-centroméricas para los cromosomas 3,  
 60 10 y 17 descritas en los Ejemplos.

Una sonda específica de locus hibrida con un locus específico no repetitivo en un cromosoma. Los ejemplos no limitantes de sondas específicas de locus incluyen sondas para los loci de los genes Her2, 1q25 y TOP2A descritas en los Ejemplos. Algunos loci comprenden genes, por ejemplo, oncogenes y genes supresores de tumores que están  
 65 modificados en algunas formas de cáncer de mama. De esta manera, en los métodos de identificación descritos en el presente documento pueden usarse sondas que se dirigen a estos genes, incluyendo exones, intrones o secuencias

cromosómicas reguladoras de los genes. Los ejemplos no limitantes de genes diana incluyen *HER-2/neu*, *TOP2A* y *PTGS2*.

5 En el mercado están disponibles sondas que hibridan con ADN centromérico y loci cromosómicos específicos, en Abbott Molecular Inc. (Des Plaines, Ill.) y Molecular Probes, Inc. (Eugene, Oreg.). Como alternativa, las sondas pueden fabricarse de forma no comercial usando técnicas bien conocidas. Las fuentes de ADN para usar en la construcción de sondas de ADN incluyen ADN genómico, secuencias de ADN clonado tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), híbridos de células somáticas que contienen uno o una parte de un cromosoma humano junto con el  
10 complemento del cromosoma normal del hospedador y cromosomas purificados por citometría de flujo o microdissección. La región de interés puede aislarse por clonación o por amplificación específica de sitio mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Véase, por ejemplo, Nath, et al., *Biotechnic Histochem*, 1998, 73 (1): 6-22; Wheelless, et al., *Cytometry*, 1994, 17:319-327; y Patente de Estados Unidos N° 5.491.224. También pueden usarse sondas de APN o ADN oligomérico sintetizado.

15 Puede variar el tamaño de la región cromosómica detectada por las sondas usadas en la invención, por ejemplo, desde la secuencia de sonda alfa-satélite de 171 pares de bases indicada anteriormente a un segmento largo de 900.000 bases. Para sondas específicas de locus que se marcan directamente, se prefiere usar sondas de al menos 100.000 bases de complejidad y usar ácido nucleico bloqueante no marcado, como se divulga en la Patente de Estados Unidos N° 5.756.696, incorporada en el presente documento por referencia, para evitar la unión no específica  
20 de la sonda. También es posible usar ácido nucleico oligomérico sintetizado, no marcado o ácido nucleico de proteína como ácido nucleico bloqueante. Para fijar como objetivo un locus de un gen particular, se prefiere que las sondas abarquen aproximadamente el locus de codificación genómica completo del gen.

25 Las sondas cromosómicas pueden contener cualquier resto de detección que facilite la detección de la sonda cuando se hibrida con un cromosoma. Los restos de detección eficaces incluyen marcadores tanto directos como indirectos, como se describe más adelante.

Las sondas cromosómicas pueden marcarse directamente con un marcador que pueda detectarse. Los ejemplos de marcadores que pueden detectarse incluyen fluoróforos (es decir, moléculas orgánicas que son fluorescentes después  
30 de absorber luz), isótopos radiactivos (por ejemplo, <sup>32</sup>P y <sup>3</sup>H) y cromóforos (por ejemplo, marcadores enzimáticos que producen un marcador que puede detectarse visualmente). Se prefieren los fluoróforos y pueden marcarse directamente después de la unión covalente a un nucleótido mediante la incorporación del nucleótido marcado en la sonda con técnicas convencionales tales como traducción con muesca, cebado aleatorio y marcaje por PCR. Como alternativa, los nucleótidos de desoxicitidina dentro de la sonda pueden transaminarse con un conector. Después, el fluoróforo puede unirse de manera covalente a los nucleótidos de desoxicitidina transaminados. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.491.224 de Bittner, et al., que se incorpora en el presente documento por referencia. Se describen técnicas de marcaje de sondas en *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, Y.-S. Fan, Ed.,  
35 Cap. 2, "Labeling Fluorescence *In Situ* Hybridization Probes for Genomic Targets", L. Morrison et al., páginas. 21-40, Humana Press, © 2002 (citados a continuación como "Morrison 2002"), incorporado en el presente documento por referencia.

40 Son ejemplos de fluoróforos que pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento: ácido 7-amino-4-metilcumarin-3-acético (AMCA), Texas Red™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); 5-(y -6)-carboxi-X-rodamina, lisamina rodamina B, 5-(y -6)-carboxifluoresceína; fluorescein-5-isotiocianato (FITC); ácido 7-dietilaminocumarin-3-carboxílico, tetrametilrodamina-5-(y -6)-isotiocianato; 5-(y -6)-carboxitetrametilrodamina; ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico; ácido 6-[fluorescein 5-(y -6)-carboxamido]hexanoico; N-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a diaza-3-indacenopropiónico; eosin-5-isotiocianato; eritrosina-5-isotiocianato; 5-(y -6)-carboxi-rodamina 6G; y acetilazida azul Cascades™ (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR).

50 Cuando se usan sondas múltiples, pueden elegirse fluoróforos de colores diferentes de tal manera que cada sonda cromosómica en el conjunto pueda visualizarse claramente. Preferentemente, el panel de sondas de la invención comprenderá dos o tres sondas separadas, cada una marcada con un fluoróforo distinto. Puede preferirse el uso de cuatro sondas ya que proporciona el mejor equilibrio entre la sensibilidad clínica (la sensibilidad puede aumentar al añadir sondas) y la complejidad de la formación de imágenes/detección (la complejidad puede aumentar al añadir  
55 sondas). También está dentro del alcance de la invención usar paneles múltiples secuencialmente en la misma muestra: en esta realización, después de que hibride el primer panel, se forman imágenes de los resultados, se elimina el tinte de la muestra y después se hibrida con un segundo panel. Los paneles múltiples también pueden hibridarse cada uno con una porción diferente de la misma muestra de ensayo, por ejemplo, a secciones en serie procedentes de un bloque de parafina de una muestra de ensayo fijada e incluida.

60 Pueden visualizarse las sondas con un microscopio de fluorescencia y un filtro apropiado para cada fluoróforo o por conjuntos de filtros de paso de banda doble o triple para observar múltiples fluoróforos. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.776.688 de Bittner, et al., que se incorpora al presente documento por referencia. Puede usarse cualquier método de formación de imágenes por microscopía adecuado para visualizar las sondas hibridadas,  
65 incluyendo sistemas formadores de imágenes digitales automatizados, tales como los disponibles en MetaSystems o Applied Imaging. Como alternativa, pueden usarse técnicas tales como citometría de flujo para examinar el patrón de

hibridación de las sondas cromosómicas.

Las sondas también pueden marcarse indirectamente, por ejemplo, con biotina o digoxigenina por medios bien conocidos en la técnica. Sin embargo, entonces se requieren moléculas de detección secundarias o un procesamiento adicional para la visualización de las sondas marcadas. Por ejemplo, una sonda marcada con biotina puede detectarse por avidina conjugada con un marcador que puede detectarse, por ejemplo, un fluoróforo. Adicionalmente, la avidina puede conjugarse con un marcador enzimático tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante. Los marcadores enzimáticos de este tipo pueden detectarse en reacciones colorimétricas convencionales usando un sustrato para la enzima. Los sustratos para fosfatasa alcalina incluyen 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul tetrazolio. El diaminobenzoato puede usarse como un sustrato para peroxidasa de rábano picante.

Las sondas y conjuntos de sondas útiles con los métodos de la invención pueden envasarse con otros reactivos en kits que van a usarse en la realización de los métodos de la invención. Los conjuntos de sonda y kits útiles pueden consistir en sondas para *HER-2/neu* y sondas para dos o más de los loci genéticos 1q25 y el gen PTGS2 (1a31), una sonda para enumerar el cromosoma 10 y TOP2A. Adicionalmente, los conjuntos de sonda y kits incluyen una o más sondas de referencia tales como una sonda para enumerar el cromosoma 17.

**Pre-selección de células.** Las muestras de células pueden evaluarse de manera preliminar por una variedad de métodos y usando una variedad de criterios. Las sondas y métodos descritos en el presente documento no están limitados al uso con una metodología de selección particular. Un ejemplo es el "método de selección" donde el observador explora de cientos a miles de células para detectar anomalías citológicas, por ejemplo, que se visualizan con un filtro DAPI. El número de células evaluadas dependerá de la celularidad de la muestra de ensayo, que varía de un paciente a otro. Comúnmente, pero no invariablemente, las anomalías citológicas asociadas con células displásicas y neoplásicas incluyen aumento del núcleo, irregularidad del núcleo y tinción DAPI anómala (frecuentemente moteada y de color más claro). En la etapa de selección, preferentemente el observador centra la evaluación de las células con respecto a anomalías cromosómicas (como se demuestra por FISH) en aquellas células que también presentan anomalías citológicas. Además, puede evaluarse una proporción de las células que no tienen anomalías citológicas obvias ya que también se producen anomalías cromosómicas en la ausencia de anomalías citológicas. El método de selección se describe con más detalle en la Patente de Estados Unidos N° 6.174.681 de Halling, et al., que se incorpora al presente documento por referencia. Las células de cáncer de mama pueden seleccionarse para la evaluación usando el método descrito en el panel de FISH PathVysion® vendido comercialmente por Abbott Molecular Inc. En el presente documento se incorpora por referencia el prospecto del panel de FISH PathVysion. Este procedimiento usa un portaobjetos teñido con H&E del mismo bloque de tumor que el portaobjetos para FISH. La región de interés se selecciona visualizando el portaobjetos teñido con H&E, preferentemente por un anatomopatólogo y la región correspondiente está marcada en el portaobjetos de FISH. Las células con consistencia en morfología con tumor maligno (es decir, núcleos de mayor tamaño) se enumeran dentro de la región marcada de interés.

**Preparación de muestras.** La identificación de un paciente candidato (por ejemplo, paciente con cáncer de mama) para el tratamiento con una medicación que se cree que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora *HER-2* o de otro modo comparable con trastuzumab puede determinarse identificando aberraciones cromosómicas en una muestra biológica apropiada obtenida del paciente. Esto puede conseguirse por hibridación *in situ*. En general, la hibridación *in situ* incluye las etapas de fijación de una muestra biológica, hibridación de una sonda cromosómica con el ADN diana contenida dentro de la muestra fijada, lavado para retirar la sonda que se ha unido de manera no específica y la detección de la sonda hibridada. La hibridación *in situ* también puede realizarse con las células de muestra de ensayo en la suspensión líquida, seguido de la detección por citometría de flujo. Como alternativa, el número de copias del gen y la amplificación pueden evaluarse por otros métodos, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Dentro de los siguientes artículos se incluyen como ejemplos descripciones de mediciones del gen *HER2* por PCR: Willmore, et al., (2005) Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology 13(4): 333-341; Lyon et al. (2001) Clinical Chemistry 47(5): 844-851; Li et al. (1994) 73(11): 2771-2778 y O'Malley et al. (2001) American Journal of Clinical Pathology 115(4): 504-511.

Las células anómalas se caracterizan por números anómalos de cromosomas dentro de las células y/o alteraciones estructurales dentro de los cromosomas de las células. Las alteraciones estructurales pueden incluir ganancias o pérdidas (por ejemplo, pérdida de heterocigosidad u homocigosidad) de una región cromosómica específica, tales como un locus o región centromérica como se indica en los Ejemplos. De acuerdo con esto pueden crearse indicadores de ensayo positivos. Por ejemplo, una célula que tiene una o más ganancias cromosómicas, es decir, tres o más copias de cualquier locus diana dado, puede considerarse positiva a ensayo en los métodos descritos en el presente documento. Las células que presentan monosomía o nulisomía también pueden considerarse positivas a ensayo en ciertas circunstancias.

Una muestra biológica es una muestra que contiene células o material celular, por ejemplo, células o material derivado de la mama. Los ejemplos de muestras de ensayo de mama incluyen biopsias de mama y similares. Típicamente, las células se recogen de una muestra biológica y se preparan usando técnicas bien conocidas en este campo. Se dispone de numerosos métodos para recoger células para su evaluación. Por ejemplo, las células de la mama se recogen usando técnicas bien conocidas tales como aspiración con aguja fina (FNA). Se preparan frotis citológicos convencionales extendiendo las células uniformemente y dejándolas muy esparcidas en un portaobjetos de vidrio.

Entonces, el portaobjetos se fija rápidamente por inmersión en etanol al 95 % o pulverizando con un fijador comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células de la mama también se recogen para histología por biopsia con aguja gruesa o biopsia quirúrgica y típicamente también se fijan en solución de formalina y se incluyen en parafina.

5 **Detección de anomalías cromosómicas.** La ganancia o pérdida de cromosomas o de regiones cromosómicas dentro de una célula se evalúa examinando el patrón de hibridación de la sonda cromosómica o conjunto de sondas cromosómicas (por ejemplo, el número de señales para cada sonda) en la célula y registrando el número de señales. Las muestras de ensayo pueden comprender cualquier número de células que es suficiente para un diagnóstico clínico, y típicamente contienen al menos aproximadamente 100 células. En un ensayo típico, el patrón de hibridación se evalúa aproximadamente en 20-200 células. Típicamente, las muestras de ensayo se consideran "positivas a ensayo" por anomalía de un locus genético particular cuando se observa que contienen una pluralidad de células que contienen la anomalía (por ejemplo, la ganancia o pérdida del locus). Los criterios para "positivos a ensayo" pueden incluir positivos a ensayo con una, dos, tres, cuatro o más sondas dependiendo de la correlación clínica entre los loci anómalos y la respuesta del paciente a la terapia. Además, cuando se usan múltiples sondas, el resultado positivo a ensayo puede incluir la detección de patrones de hibridación anómalos con un subconjunto de sondas. Por ejemplo, una combinación de ganancias o pérdidas de un subconjunto de las sondas, por ejemplo dos o tres sondas de un conjunto completo de cuatro sondas, puede producir un resultado de ensayo positivo. También pueden evaluarse patrones de hibridación en secuencia para subconjuntos de sondas. Por ejemplo, puede evaluarse el patrón de un subconjunto inicial de sondas (por ejemplo, las sondas para los loci *HER-2* y *TOP2A*) y, si se indica un resultado positivo del subconjunto de sondas, el ensayo puede considerarse positivo en su conjunto. Sin embargo, si el resultado inicial no es positivo, puede evaluarse el patrón para un subconjunto adicional de sondas (por ejemplo, una sonda para el locus 1q25) para completar el ensayo. Si el resultado combinado para todas las sondas indica un resultado de ensayo positivo, el ensayo puede considerarse positivo en su conjunto.

25 El número de células identificadas con anomalías cromosómicas y usadas para clasificar una muestra particular como positiva en general variará con el número de células en la muestra. El número absoluto de células detectadas con anomalía cromosómica o el porcentaje del número total de células examinadas que contienen la anomalía pueden usarse para determinar si una muestra es positiva por comparación con un valor de límite. Si, por ejemplo, el número o porcentaje de células con anomalía es igual o inferior al valor de límite, entonces la muestra de ensayo puede clasificarse como negativa para la anomalía. Si el número o porcentaje de células con anomalía es mayor que el valor de límite, entonces la muestra de ensayo puede clasificarse como positiva. Las muestras de ensayo positivas para una o un conjunto particular de anomalías cromosómicas pueden clasificarse en función de la respuesta probable del paciente a la medicación. Como alternativa, la positividad de la muestra de ensayo con respecto a una anomalía cromosómica puede determinarse a partir del número de copias promedio de un locus por célula en la muestra de ensayo o la proporción promedio de un número de copias de locus con respecto a un segundo número de copias de locus para esa muestra de ensayo. Se consideran positivas las muestras de ensayo que tienen números de copia promedio de un locus particular por célula por encima de un límite establecido para una ganancia anómala de un locus, o inferior a un límite establecido para una pérdida anómala de un locus para la anomalía específica. De forma similar, los límites pueden establecerse para la ganancia o pérdida relativa ente dos loci diferentes y se aplican a la proporción de los loci medida para establecer si una muestra es positiva o negativa para esa anomalía.

Los detalles de la invención se describen adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica. Un experto en la materia reconocerá que pueden resultar evidentes variaciones y modificaciones de la invención al revisar la presente memoria descriptiva. Por consiguiente, es un objeto proporcionar tales modificaciones y variaciones de las realizaciones descritas en el presente documento, sin apartarse del alcance o espíritu de la invención.

### Ejemplos

50 **Sondas de hibridación.** Se usaron los clones siguientes como sondas de mapeo FISH: 291U (de una biblioteca BAC o PAC de Roswell Park Cancer Institute (RPCI), designado RPCI-11-283I23), 291P (RPCI-5-1152A16), 291F (de una biblioteca BAC del California Institute of Technology (CIT), designado CITC-428H21), LSI® TOP2A (291Z.2; Abbott Molecular Inc.), 291Z.7 (RPCI-11-89A22) y 291Z.8 (RPC-11-1028K7). Los clones de mapeo se encuentran dentro de una región contigua que comienza aproximadamente en 114 kb teloméricas de la sonda *HER-2* de Vysis LSI y que se extiende aproximadamente 650 kb hacia el telómero de 17q. Cada hibridación *in situ* con sondas de mapeo incluyeron 3 sondas FISH directamente marcadas con fluoróforos diferentes: una sonda peri-centromérica para el cromosoma 17 (SpectrumAqua™ CEP® 17; Abbott Molecular Inc.), SpectrumGreen™ LSI *HER-2* (Abbott Molecular Inc.) y una de las 6 sondas de mapeo marcadas con SpectrumOrange™.

60 Se usaron los clones siguientes como sondas de transducción de señales: LSI PTEN (Abbott Molecular Inc.), LSI 1q25 (Abbott Molecular Inc.), PTGS2 (RPCI-11-70N10, RPCI-11-809F11, RPCI-11-104B23, RPCI-11-457L10, RP-CI-11-339I2), PIK3CA (RPCI-11-355N16, CITD-2354L18, CITD-3030M16, RPCI-11-360P21, CITD-2109M3, CITD-2537A7) y AKT3 (CITD-2011E13, RPCI-11-351N5, RPCI-11-119H6). Las sondas de transducción de señales se hibridaron con paneles de sonda de 3 y 4 colores con cada sonda marcada directamente como un fluoróforo espectralmente distinto. El panel 1 incluyó: SpectrumGreen LSI 1q25, SpectrumGold™ PTGS2, SpectrumRed™ AKT3. El panel 2 incluyó: una sonda peri-centromérica para el cromosoma 3 (SpectrumGreen CEP 3; Abbott Molecular

Inc.), SpectrumGold Pik3CA, SpectrumRed PTEN y una sonda peri-centromérica para el cromosoma 10 (SpectrumGreen CEP 10; Abbott Molecular Inc.). Las sondas no disponibles en el mercado se marcaron de acuerdo con los métodos divulgados en las Patentes de Estados Unidos N° 5.491.224 y N° 5.506.350 incorporadas en el presente documento por referencia. Las sondas se disolvieron en una solución de hibridación compuesta por 7 partes de tampones de hibridación Vysis LSI y 3 partes de agua. Las sondas y reactivos designados con LSI, CEP o Vysis en el nombre son productos comerciales obtenidos de Abbott Molecular, Inc., Des Plaines, IL.

**Muestras de ensayo.** Se consideraron para el estudio setenta pacientes con carcinoma de mama metastásico que se habían tratado en el centro médico de Rush Presbyterian St. Luke, Chicago, IL con trastuzumab entre 1997 y 2004. Esto comprendía a todos los pacientes de cáncer de mama metastásico tratados con trastuzumab de los que se disponía un tejido tumoral preterapia archivístico adecuado en los archivos patológicos. Se aprobó el estudio por la junta de revisión institucional de Rush. Los pacientes se habían tratado solamente con trastuzumab o con trastuzumab en combinación con quimioterapia convencional, un taxano en casi todos los casos. Esencialmente todos los pacientes se habían tratado ampliamente con anterioridad con una variedad de regímenes de quimioterapia. Después de una revisión de gráfico intensiva de estos pacientes, se determinó que 35 de ellos había progresado mientras estaba sometido a la terapia con trastuzumab (EP), tenían una enfermedad estable (EE) durante al menos seis meses, una respuesta parcial (RP) o una respuesta completa (RC), de acuerdo con los criterios RECIST. Se consideró que estos 35 pacientes eran adecuados para la inclusión en el estudio. Para los otros pacientes, los registros médicos disponibles no indicaron claramente si el paciente respondió o no al trastuzumab o no se disponía de los registros médicos informativos.

El diagnóstico del carcinoma de mama en el material archivístico se confirmó por evaluación histológica antes de análisis adicionales. Había suficiente material archivístico disponible para todos los pacientes incluidos para asegurar que el estudio no agotaba el tejido del tumor del diagnóstico.

Se seccionaron bloques de parafina que contenían muestras de ensayo de biopsias del tejido en espesores de 5 µm y se montaron sobre portaobjetos cargados positivamente SuperFrost Plus® (ThermoShandon, Pittsburgh, PA). Todos los portaobjetos se calentaron a 56 °C durante una noche para fijar el tejido en los portaobjetos y después se almacenaron a temperatura ambiente.

**Hibridación in situ:** En la preparación para la hibridación *in situ*, se desparafinaron portaobjetos de muestras de ensayo mojándose en 3 cambios de agente de limpieza y disolvente Hemo-De™ (Scientific Safety Solvents, Keller, TX) durante 5 minutos cada uno, seguidos de dos enjuagues de 1 minuto en etanol absoluto. Después del secado, las muestras de ensayo se prepararon adicionalmente para la hibridación *in situ* por inmersión de los portaobjetos en una solución de pretratamiento de Vysis (solución caotrópica basada en tiocianato de sodio) a 80 °C durante 10 minutos y enjuagado en agua durante 5 minutos. Después, los portaobjetos se sumergieron en una solución de 4 mg de pepsina (2500-3000 U/mg) por ml de HCl 0,2 N a 37 °C durante 15 minutos, se enjuagaron en agua durante 3 minutos, se deshidrataron en etanol al 70 %, 85 % y 100 % cada uno durante 1 minuto y se dejaron secar. La solución de pretratamiento, HCl 0,2 N, y pepsina están disponibles en el mercado en forma de kit (Paraffin Pretreatment 2, N° Cat. 32-191095, Abbott Molecular, Inc.).

Los portaobjetos de muestras de ensayo preparados se hibridaron con soluciones de sonda FISH en un horno codesnaturalizado automatizado HYBrite™ (Abbott Molecular, Inc.). Los portaobjetos se pusieron en la superficie del horno, la solución de la sonda se puso sobre la sección del tejido (típicamente 10 µl), se aplicó un cubreobjetos sobre la solución de la sonda y los bordes del cubreobjetos se sellaron al portaobjetos con adhesivo de caucho. El ciclo de codesnaturalización/hibridación del horno se configuró para la desnaturalización a 73 °C durante 5 minutos y la hibridación a 37 °C durante 16-18 h. Después de la hibridación, los portaobjetos se retiraron de HYBrite y se retiró el adhesivo de caucho. Los portaobjetos se pusieron en 2X SSC a temperatura ambiente (SSC = NaCl 0,3 M, citrato de sodio 15 mM)/Nonidet P40 al 0,3 % (NP40; Abbott Molecular, Inc.) durante 2 a 10 minutos para retirar los cubreobjetos. Después, los portaobjetos se sumergieron en 2X SSC a 73 °C/NP40 al 0,3 % durante 2 minutos para la retirada de la sonda unida no específicamente y se dejó secar en la oscuridad. Se aplicó la solución antifade DAPI I (1000 ng de DAPT/ml en la solución montante de fluorescencia; Abbott Molecular, Inc.) a la muestra de ensayo para permitir la visualización de los núcleos.

Algunas de las muestras de ensayo necesitaron un procesamiento adicional para producir resultados FISH óptimos. Las muestras de ensayo resultantes de la sobredigestión se volvieron a procesar comenzando con un nuevo portaobjetos de muestra de ensayo. Estos portaobjetos se procesaron en condiciones más leves (protocolo y reactivos de Paraffin Pretreatment de Vysis, como se ha descrito previamente (Jacobson et al., 2000)). Los portaobjetos no digeridos suficientemente se expusieron al siguiente tratamiento adicional. Primero, los cubreobjetos se retiraron remojando los portaobjetos en 2X SSC/NP40 al 0,3 % a temperatura ambiente. A continuación, los portaobjetos se enjuagaron en agua purificada y se incubaron durante 5-10 minutos en 4 mg de pepsina/ácido clorhídrico 0,2 N a 37 °C. Los portaobjetos se enjuagaron de nuevo en agua purificada y se pasaron a través de una serie de deshidratación de etanol. Después del secado, los portaobjetos volvieron a hibridarse en las mismas condiciones que se usaron para la hibridación original.

**Enumeración de señales FISH.** Los portaobjetos FISH se evaluaron con un microscopio de epi-fluorescencia Zeiss Axioscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Las señales se visualizaron y el recuento se llevó a cabo usando conjuntos de filtros de un solo paso de banda DAPI para visualizar los núcleos (un conjunto de filtros de un solo paso de banda naranja para visualizar las sondas marcadas con SpectrumOrange, un conjunto de filtros de un solo paso de banda verde para visualizar las sondas de SpectrumGreen, un conjunto de filtros de un solo paso de banda de agua para visualizar las sondas de SpectrumAqua, un conjunto de filtros de un solo paso de banda rojo para visualizar las sondas de SpectrumRed y un conjunto de filtros de un solo paso de banda de oro para visualizar las sondas de SpectrumGold (todos los conjuntos de filtros procedentes de Abbott Molecular Inc.)). Se contaron un mínimo de 30 núcleos con morfología maligna. Para cada sonda y cada muestra de ensayo, se calculó el número medio de señales por célula totalizando el número de señales de sonda correspondientes en todas las células enumeradas y dividiendo por el número total de células enumeradas. Las señales medias de sonda de mapeo y *HER-2* por célula se dividieron por las señales medias CEP 17 por célula para producir el número medio de cada diana por cromosoma 17. Las proporciones entre otros loci se calcularon de la misma forma dividiendo las señales medias por célula para un locus por las señales medias por célula del otro locus. Cuando se contó un portaobjetos múltiples veces, se calculó el promedio de las señales medias de sonda por célula de cada evaluación y se usó para volver a calcular las proporciones.

Para *HER-2*, se consideró que una proporción *HER-2*/CEP 17 de 2,0 o mayor era una amplificación debido a que este valor se ha usado en varios estudios publicados que investigan la amplificación de *HER-2* y su relación con la expresión y el resultado del paciente (Pauletti et al., 1996, 2000; Pauletti y Slamon, 1999; Persons et al., 2000). Como TOP2A y las dianas de otras sondas de mapeo están asociadas con el amplicón *HER-2* cuando se amplifica, se usó el mismo límite de 2,0 para distinguir las muestras de ensayo amplificadas de las no amplificadas en evaluaciones iniciales. El límite usado para delección fue de 0,75 (Jacobson et al. 2004). Cada uno de los otros loci se evaluó usando señales por célula así como proporciones cuando era aplicable. Se seleccionaron múltiples conjuntos de valores de límite para categorizar cada locus diana. Los valores de límite finales se seleccionaron basándose en la capacidad de discriminar entre la respuesta del paciente buena o pobre a la terapia. La RC o RP se categorizó como respuesta objetiva y la EP o EE se categorizó como respuesta pobre o ausencia de respuesta. El beneficio clínico se definió como RC, RP o EE.

Para conservar muestras de ensayo valiosas de pacientes tratados con trastuzumab, se desarrolló una estrategia para hibridar las sondas de mapeo que minimizaba el número de hibridaciones requeridas. El estudio de mapeo publicado (Jacobson et al., 2004) demostró un patrón contiguo de manera predominante de amplificación dentro de la región de mapeo 17q en la que reside *Her-2*. Es decir, si se amplificaba una de las sondas de mapeo en situación telomérica con respecto a *HER-2*, entonces todas las sondas que se situaban entre esa sonda y *HER-2* también mostraban amplificación. Esto ocurrió en 67 de los 75 tumores evaluados (89 %). Por consiguiente, para minimizar el número de secciones de muestra de ensayo utilizadas, se hibridaron las sondas de mapeo comenzando con la sonda LSI@ TOP2A. Si se observaba que el estado de la muestra de ensayo se amplificaba para TOP2A (valor de límite de 2,0), no se evaluaban todos los clones de mapeo centroméricos con respecto a TOP2A y se asumió que se amplificaban). Después se ensayó la sonda 291Z.7 y si se amplificaba, no se ensayaba el clon contiguo centromérico con respecto a 291Z.7, 291Z.8, y se asumía que se amplificaba. Si 291Z.7 no se amplificaba, entonces se ensayaba 291Z.8. Sin embargo, si las muestras de ensayo no se amplificaban para LSI@ TOP2A, entonces se ensayaba 291P. Si se amplificaba 291P, entonces se ensayaba 291F y si 291P no se amplificaba entonces se ensayaba 291U, indicando la diana amplificada más telomérica y estableciendo el límite telomérico del amplicón *HER-2*.

Se analizaron las sondas de transducción de señales usando señales de sonda promedio por célula o proporciones de señales de sonda por cromosoma de referencia para clasificar las muestras de ensayo como normales, con ganancia, delecionadas o amplificadas para loci particulares. La clasificación eficaz de pacientes con respecto a la respuesta se consiguió usando límites de 3,0 y 1,5 señales/célula para ganancia y pérdida del locus 1q25, respectivamente, 2,75 y 1,6 señales/célula para ganancia y pérdida del locus PTGS2, respectivamente, y 2,75 y 1,7 señales/célula para ganancia y pérdida del cromosoma 10 (CEP 10), respectivamente. Los límites de 3,0 y 1,6 señales/célula para ganancia y pérdida del locus AKT3, respectivamente, proporcionaron una clasificación óptima aunque no estadísticamente significativa.

Para proporciones de *HER-2* o sondas de mapeo para el cromosoma 17 (representado por señales CEP 17), las proporciones de 2,0 o mayores se clasificaron como amplificadas, las proporciones entre 0,75 y 2,0 se clasificaron como normales y las proporciones menores que o iguales a 0,75 se clasificaron como delecionadas (Jacobson et al., 2004). Para las sondas de transducción de señales, se establecieron límites empíricamente para maximizar la correlación entre la respuesta del paciente y los estados genéticos de los loci. Se examinaron los valores de límite menores de 2 señales/célula para delinear la delección de un locus del número de copias normal y se examinaron los valores de límite mayores de 2 para delinear la ganancia de un locus del número de copias normal. El análisis de contingencia se usó para categorizar la respuesta del paciente con respecto al estado genómico y los valores-p se calcularon usando el ensayo exacto de Fisher (bilateral; <0,05 considerado significativo).

## RESULTADOS

**Resultados de enumeración.** De los 70 pacientes considerados para el estudio, 35 tuvieron respuestas a la terapia interpretables y muestras de ensayo que produjeron señales FISH enumerables para las sondas de mapeo. Treinta y

cuatro muestras de ensayo produjeron señales FISH enumerables para las sondas de ruta de transducción de señales. Una muestra de ensayo de 35 pacientes contenía dos clones de tumor únicos; se seleccionó el más anómalo de los clones para ser analizado. Los 35 tumores contenían material suficiente para permitir la finalización del estudio de mapeo y de conjuntos de sondas de transducción de señales.

5 **Respuesta general a la terapia.** La respuesta a la terapia se consideró Respuesta Objetiva (RC + RP) y Beneficio Clínico (EE + RC + RP). La Respuesta Objetiva se encontró en 14 (40 %) de los 35 pacientes, comparado con 20 (57 %) de los 35 pacientes que mostraban Beneficio Clínico (Tabla 1).

10 Tabla 1. Sumario de respuesta a terapia

Respuesta a la Terapia					Respuesta Objetiva (%)	Beneficio Clínico (%)
RC	RP	EE	EP		14/35 (40 %)	20/35 (57 %)
10	4	6	15			
RC significa respuesta completa; PR significa respuesta parcial; EE significa enfermedad parcial; y EP significa enfermedad progresiva.						

15 **Mapeo de HER-2/TOP2A.** Para pacientes con amplicones que no se extienden más allá de la región de sonda de HER-2, el 57 % tuvieron respuesta objetiva. Para amplicones que se extienden a cada una de las 6 sondas de mapeo teloméricas de HER-2, las respuestas objetivas se encontraron en el 50 %, 100 %, 67 %, 0 %, 0 % y 12,5 % respectivamente (Tabla 2). El cincuenta y siete por ciento de los pacientes con amplicones que no se extienden más allá de HER-2 mostraron Beneficio Clínico. Para amplicones que se extienden a cada una de las 6 sondas de mapeo teloméricas de HER-2, el Beneficio Clínico se encontró en el 67 %, 100 %, 100 %, 25 %, 50 % y 50 % respectivamente. Estos datos indican que la respuesta es mejor cuando el amplicón no contiene el locus TOP2A. Agrupando a los

20 pacientes en los que el amplicón no se extiende al locus TOP2A y en los que el amplicón incluye el locus TOP2A, la Respuesta Objetiva se encontró en el 62 % (13/21) en el primer grupo y el 7,1 % (1/14) en el último grupo (p=0,0015). El Beneficio Clínico se encontró en el 67 % (14/21) en el primer grupo y en el 43 % (6/14) en el último grupo (p=0,19). Estos datos muestran que el estado del gen de TOP2A es un indicador fuerte de la Respuesta Objetiva, identificando un grupo de pacientes (HER-2 amplificado y TOP2A no amplificado) que responde más de 1,5 veces mejor que la tasa de respuesta general (no seleccionada) e identificando un segundo grupo (HER-2 y TOP2A amplificado) que recibirá un beneficio pequeño de la terapia con trastuzumab. En términos de Beneficio Clínico, es marginal la mejora en la clasificación del paciente proporcionada por el estado TOP2A. Generalmente hablando, la Respuesta Objetiva se considera más informativa que el Beneficio Clínico puesto que puede ser difícil saber si la EE es el resultado del

25 tratamiento.

30 Los dos loci de mapeo en cualquier lado del locus TOP2A, 291F y 291Z.8, también proporcionaron una clasificación de pacientes en cuanto a la Respuesta Objetiva al trastuzumab que era una mejora sobre la amplificación de HER-2 sola. Para el locus 291F, la Respuesta Objetiva se encontró en el 60 % (9/15) del grupo de HER-2 amplificado y 291F no amplificado y el 25 % (5/20) cuando se amplificó 291F (p=0,080, significado estadístico marginal). Para el locus 291Z.8, se encontró la Respuesta Objetiva en el 52 % (13/25) del grupo de HER-2 amplificado y 291F no amplificado y

35 el 10 % (1/10) cuando se amplificó 291F (p=0,028).

Tabla 2. Resumen de respuesta a la terapia para el mapeo de sondas ensayadas

Respuesta a Terapia	HER-2	291U	291P	291F	TOP2A	291Z.8	291Z.7
Respuesta Objetiva (%)	4/7 (57 %)	3/6 (50 %)	2/2 (100 %)	4/6 (67 %)	0/4 (0 %)	0/2 (0 %)	1/8 (12,5 %)
Beneficio Clínico (%)	4/7 (57 %)	4/6 (67 %)	2/2 (100 %)	4/6 (67 %)	1/4 (25 %)	1/2 (50 %)	4/8 (50 %)

40 **Rutas de señalización del factor de crecimiento.** Los loci específicos para componentes de la ruta de señalización del factor de crecimiento ERBB se evaluaron por FISH para determinar la correlación con la respuesta a trastuzumab en pacientes de cáncer de mama. Los datos se analizaron como proporciones así como también señales por célula, determinándose los valores de límite en base a la respuesta a la terapia. Los datos presentados aquí se basan en señales por célula.

45 Se estudiaron tres regiones de interés en el cromosoma 1 incluyendo 1q25, el locus PTGS2 (1q31) y el locus AKT3 (1q43). De las 34 muestras ensayadas, el 59- 74 % de las muestras de ensayo fueron anómalas (locus ganados o delecionados). Las ganancias y deleciones de 1a25 y PTGS2 se asociaron con una buena respuesta a la terapia (Tabla 3). Para 1q25, el 75 % (15/20) de las muestras de ensayo anómalas mostraron Beneficio Clínico de la terapia comparada con solo el 29 % (4/14) de las muestras de ensayo normales (p=0,0135).

PTGS2 tenía el 64 % (16/25) de muestras de ensayo anómalas y el 33 % (3/9) de muestras de ensayo normales asociadas con Beneficio Clínico ( $p=0,139$ ) y *AKT3* tenía el 62 % (13/21) de muestras de ensayo anómalas y el 46 % (6/13) de muestras de ensayo normales asociadas con Beneficio Clínico ( $p=0,484$ ). La asociación con Beneficio Clínico para *PTGS2* y *AKT3* no fue estadísticamente significativa. Considerando la respuesta objetiva, 1q25 mostró el 60 % (12/20) de la respuesta en pacientes anómalos y el 14 % (2/14) de la respuesta en pacientes normales ( $p=0,0128$ ). *PTGS2* mostró el 52 % (13/25) de la Respuesta Objetiva en pacientes anómalos y el 11 % (1/9) de la respuesta en pacientes normales ( $p=0,051$ ). Estos valores fueron significativos para 1q25 y de significado estadístico límite para *PTGS2*. La ganancia y pérdida de *AKT3* no se correlacionaron con la respuesta a la terapia aunque se observa una tendencia similar a la vista con 1q25 y *PTGS2*, ya que un número mayor de muestras de ensayo anómalas en comparación con las muestras de ensayo normales son sensibles a la terapia (Tabla 3).

Se analizaron las sondas para los genes de ruta de señalización *PIK3CA* y *PTEN* y las sondas centroméricas respectivas para cromosomas 3 y 10 para determinar la correlación con la respuesta a trastuzumab en pacientes con cáncer de mama. El cromosoma 3, *PIK3CA* y *PTEN* no tenían correlación significativa con la respuesta a la terapia, Respuesta Objetiva o Beneficio Clínico. Las ganancias y pérdidas del cromosoma 10, sin embargo, se correlacionaron con una buena respuesta a trastuzumab (Tabla 4). Se encontró la Respuesta Objetiva en el 75 % (9/12) de los pacientes con Cromosoma 10 anómalo y en el 23 % (5/22) de los pacientes con cromosoma 10 normal ( $p=0,0048$ ). Se encontró el Beneficio Clínico en el 83 % (10/12) de los pacientes con el cromosoma 10 anómalo y el 41 % (9/22) de los pacientes con cromosoma 10 normal ( $p=0,030$ ).

También se usó un análisis de contingencia para categorizar la respuesta con respecto a los estatus genómicos combinados de dos locus. Cuando se combinaban en parejas la amplificación de *TOP2A*, las anomalías de 1q25, *PTGS2* o el cromosoma 10, se podía mejorar la dirección a las muestras con respecto al uso de un locus individual. Cuando el cromosoma 10 se combinó con 1q25, *PTGS2* o *TOP2A* por el análisis de contingencia, aumentó la sensibilidad para la detección de respondedores y no respondedores. Los datos de combinación del análisis de contingencia del cromosoma 10 y del locus 1q25 identificaron una población pura de respondedores a la terapia. Los pacientes que eran anómalos tanto para el cromosoma 10 como para 1q25 mostraron el 100 % (8/8) de Beneficio Clínico de la terapia mientras que el 42 % (11/26) de los otros pacientes mostraron beneficio ( $p=0,0045$ ). La Respuesta Objetiva se encontró en el 88 % (7/8) de los pacientes con anomalía tanto en el cromosoma 10 como en 1q25 mientras que el 27 % (7/26) de los otros pacientes mostraron respuesta ( $p=0,0039$ ).

Los pacientes con *TOP2A* no amplificado combinado con 1q25 anómalo mostraron Beneficio Clínico en el 86 % (12/14) de los pacientes comparados con el 35 % (7/20) que mostraron beneficio en otros pacientes ( $p=0,0051$ ). Los pacientes con *TOP2A* no amplificado combinado con 1q25 normal mostraron Respuesta Objetiva en el 79 % (11/14) de los pacientes comparados con el 15 % (3/20) que mostraron beneficio en otros pacientes ( $p=0,0003$ ).

El análisis del cromosoma 10 y de los locus *PTGS2* identificó una población pura de no respondedores a la terapia. Los pacientes normales para ambos loci tuvieron el 0 % (0/8) de Respuesta Objetiva mientras que el 64 % (14/26) de otros pacientes tuvieron respuesta ( $p=0,0109$ ). La comparación basada en el Beneficio Clínico no proporcionó una correlación significativa.

Los pacientes con *TOP2A* no amplificado combinado con *PTGS2* anómalo mostraron Beneficio Clínico en el 76 % (13/17) de los pacientes comparados con el 35 % (6/17) que mostraron beneficio en otros pacientes ( $p=0,037$ ). Los pacientes con *TOP2A* no amplificado combinado con *PTGS2* anómalo mostraron Respuesta Objetiva en el 71 % (12/17) de los pacientes comparados con el 15 % (3/20) que mostraron beneficio en otros pacientes ( $p=0,0013$ ).

Tabla 3. Resumen de los resultados FISH en pacientes que muestran Respuesta a Terapia

Locus		Anómalo		Normal	P*	Locus		Anómalo		Normal	P*
1q25	Beneficio Clínico	15		4	0,0135	1q25	Respuesta Objetiva	12		2	0,0128
		Ganancia	Pérdida					Ganancia	Pérdida		
	$CO_{ganancia} = 3,0$ $Ca_{pérdida} = 1,5$	13	2					10	2		
$CO_{ganancia} = 3,0$ $Ca_{pérdida} = 1,5$											
PTGS2	Beneficio Clínico	16		3	0,1392	PTGS2	Respuesta Objetiva	13		1	0,0504

Locus		Anómalo		Normal	P*	Locus		Anómalo		Normal	P*
		Ganancia	Pérdida					Ganancia	Pérdida		
	CO <sub>ganancia</sub> = 2,75 CO <sub>pérdida</sub> = 1,6	13	2				CO <sub>ganancia</sub> = 2,75 CO <sub>pérdida</sub> = 1,6	11	2		
AKT3	Beneficio Clínico  CO <sub>ganancia</sub> = 3,0 CO <sub>pérdida</sub> = 1,6	13		6	0,48	AKT3	Respuesta Objetiva  CO <sub>ganancia</sub> = 3,0 CO <sub>pérdida</sub> = 1,6	10		4	0,48
		Ganancia	Pérdida					Ganancia	Pérdida		
		11	2					8	2		

\*Ensayo exacto de Fisher (bilateral; <0,05 considerado significativo) que compara la respuesta con la terapia entre pacientes normales y anómalos.

Tabla 4. Resumen de Respuesta a la Terapia: CEP 10

CEP 10	Anómalo		Normal	P*	CEP 10	Anómalo		Normal	P*
Beneficio Clínico  CO <sub>ganancia</sub> = 2,75 CO <sub>pérdida</sub> = 1,7	10		9	0,0297	Respuesta Objetiva  CO <sub>ganancia</sub> = 2,75 CO <sub>pérdida</sub> = 1,7	9		5	0,0048
	Ganancia	Pérdida				Ganancia	Pérdida		
	2	8				2	7		

5 **Identificación de pacientes con cáncer de mama para el tratamiento con trastuzumab (Herceptin®).**

10 **LSI TOP2A/HER-2/CEP 17:** el conjunto de sondas de 3 colores sonda multicolor LSI TOP2A/HER-2/CEP 17 disponible en el mercado de Vysis, Inc. puede usarse para estratificar pacientes con cáncer de mama para el tratamiento con trastuzumab. Pueden prepararse muestras de biopsia de la mama para la hibridación FISH y someterse a hibridación con el conjunto de sondas como se describe anteriormente. Las células de cada muestra pueden evaluarse enumerando de 20 a 200 células secuenciales, como se describe anteriormente. Las muestras amplificadas para HER-2 y que demuestran las proporciones de señal de los 17 loci TOP2A-a-centrómero que son menores de un límite de 2,0 pueden considerarse positivas para el tratamiento con trastuzumab, mientras que otros pacientes pueden considerarse candidatos menos adecuados para el tratamiento con trastuzumab. A continuación se proporcionan ejemplos para dos pacientes (Pacientes 1 y 2).

15 **Pacientes 1 y 2**

20 Se procesaron tejidos de tumor de mama incluidos en parafina y fijados con formalina de los Pacientes 1 y 2 para FISH y se realizó FISH, como se describe anteriormente, usando el conjunto de sonda multicolor de Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange TOP2A/LSI HER2 SpectrumGreen/CEP 17 SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.). Se evaluaron los portaobjetos en un microscopio de fluorescencia como se describe anteriormente y se determinó el número de señales correspondientes a las sondas TOP2A, HER2 y CEP 17 para 30 células. Los resultados se recogen en las Tablas 5A y 5B.

25 **Tabla 5. Recuentos de señales para Pacientes 1 y 2**

Tabla 5A. Paciente 1				Tabla 5B. Paciente 2			
Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17	Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17
1	1	8	1	1	7	14	2

Tabla 5A. Paciente 1				Tabla 5B. Paciente 2			
Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17	Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17
2	1	11	1	2	7	10	1
3	2	14	2	3	3	8	1
4	1	11	1	4	7	8	1
5	1	18	1	5	7	8	2
6	1	11	1	6	5	5	2
7	1	8	1	7	6	10	2
8	1	11	1	8	4	7	2
9	1	10	1	9	6	10	2
10	1	16	1	10	7	9	2
11	1	12	2	11	6	7	1
12	1	11	1	12	6	6	2
13	1	10	2	13	7	10	2
14	1	11	1	14	6	7	1
15	1	10	1	15	7	10	1
16	1	11	2	16	7	6	2
17	1	8	1	17	10	7	2
18	1	15	1	18	7	9	1
19	1	11	1	19	6	10	1
20	1	10	1	20	5	7	1
21	1	12	1	21	7	8	2
22	1	10	1	22	5	9	1
23	1	12	1	23	6	9	2
24	1	14	1	24	7	7	2
25	2	13	1	25	7	10	2
26	1	12	1	26	7	11	2
27	1	12	1	27	6	11	2
28	1	9	1	28	6	9	2
29	1	11	2	29	4	10	2
30	1	2	1	30	5	10	2

- 5 Resultados para el Paciente 1: a partir de estos recuentos de señales, se calcularon los promedios de TOP2A/célula, HER2/célula y CEP 17/célula y fueron de 1,07, 11,1 y 1,17, respectivamente, proporcionando un valor de 0,91 TOP2A/CEP 17 y 9,5 HER2/CEP 17 para esta muestra de ensayo. Como HER2 está amplificado (HER2/CEP 17 > 2,0) y TOP2A no está amplificado (TOP2A/CEP 17 < 2,0), se considera al paciente un muy buen candidato para la terapia con trastuzumab. Se trató al Paciente 1 con trastuzumab y mostró una respuesta completa al fármaco por los criterios RECIST.
- 10 Resultados para el Paciente 2: a partir de estos recuentos de señal, se calcularon los promedios de TOP2A/célula, HER2/célula y CEP 17/célula y fueron de 6,20, 8,73 y 1,67, respectivamente, proporcionando un valor de 3,7 TOP2A/CEP 17 y 5,2 HER2/CEP 17 para esta muestra de ensayo. Como HER2 está amplificado (HER2/CEP 17 > 2,0), el paciente es un candidato potencial para la terapia con trastuzumab, sin embargo, como también está

amplificado TOP2A (TOP2A/CEP 17 > 2,0), es menos probable que el paciente responda al tratamiento que los pacientes para los que TOP2A no se ha amplificado y deberían considerarse tratamientos alternativos. Se trató al Paciente 2 con trastuzumab y mostró enfermedad progresiva por criterios RECIST.

5 **LSI Her-2, LSI TOP2A, CEP 17 y LSI 1q25:** las 4 sondas LSI Her-2, LSI TOP2A, CEP 17 y LSI 1q25 pueden usarse para estratificar a los pacientes con cáncer de mama para el tratamiento con trastuzumab. El conjunto de sondas multicolor Vysis SpectrumOrange LSI TOP2A/SpectrumGreen LSI HER2/SpectroAqua CEP 17 puede usarse como fuente para estas sondas. La sonda SpectrumGreen LSI 1q25 descrita anteriormente puede hibridarse en una segunda hibridación, o pueden cambiarse marcadores para permitir la hibridación y análisis de las 4 sondas  
10 simultáneamente (por ejemplo, usando marcadores SpectrumAqua, SpectrumGreen, SpectrumGold y SpectrumRed). Se prepararon las muestras de biopsia de mama para la hibridación FISH y se sometieron a hibridación como se describe anteriormente. Las células de cada muestra se evaluaron enumerando de 20 a 200 células secuenciales, como se describe anteriormente. Las muestras amplificadas para HER-2 y que demuestran proporciones de señales los 17 loci de TOP2A-a-centrómero que son menos que un límite de 2,0, y que demuestran señales 1q25 por célula  
15 que son mayores que un límite de 3,0 o menores de un límite de 1,5 se consideran positivas para el tratamiento con trastuzumab, mientras que otros pacientes se consideran candidatos menos adecuados para el tratamiento con trastuzumab. A continuación se proporcionan ejemplos para los dos pacientes (Pacientes 3 y 4).

#### 20 **Pacientes 3 y 4**

Se procesó tejido de tumor de mama incluido en parafina y fijado con formalina de los Pacientes 3 y 4 para FISH y se realizó FISH, como se describe anteriormente, usando el conjunto de sondas multicolor de Vysis LSI TOP2A SpectrumOrange/LSI HER2 SpectrumGreen/CEP 17 SpectrumAqua (Abbott Molecular, Inc.) en un conjunto de portaobjetos y el conjunto de sondas Vysis SpectrumGreen LSI 1q25/SpectrumGold PTGS2/SpectrumRed AKT3  
25 como una fuente de sonda 1q25 en un conjunto separado de portaobjetos. Los portaobjetos se evaluaron en un microscopio de fluorescencia como se describe anteriormente y se determinó el número de señales correspondientes a las sondas TOP2A, HER2, CEP 17 y 1q25 para 30 células. Los resultados se recogen en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Recuentos de señal para Paciente 3

Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17	Nº célula	1q25
1	4	23	5	1	2
2	4	13	6	2	3
3	4	13	6	3	1
4	4	13	4	4	1
5	3	18	3	5	3
6	2	18	2	6	3
7	6	18	6	7	3
8	5	18	7	8	3
9	3	18	5	9	4
10	3	28	7	10	6
11	2	18	5	11	9
12	4	18	7	12	6
13	5	18	6	13	2
14	3	13	2	14	5
15	5	18	6	15	6
16	4	18	5	16	6
17	4	18	2	17	5
18	4	23	3	18	5
19	2	23	4	19	3
20	4	13	3	20	1

Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17	Nº célula	1q25
21	3	13	4	21	2
22	2	13	2	22	6
23	2	18	2	23	6
24	2	23	2	24	3
25	3	13	4	25	4
26	2	13	2	26	4
27	2	13	3	27	3
28	1	13	2	28	8
29	3	8	1	29	6
30	2	13	2	30	5

Resultados para el Paciente 3: a partir de estos recuentos de señales, se calcularon los promedios de TOP2A/célula, HER2/célula y CEP 17/célula y fueron de 3,2, 16,2, 3,9 y 4,1, respectivamente, proporcionando un valor de 0.82 TOP2A/CEP 17 y 4,1 HER2/CEP 17 para esta muestra de ensayo. Como HER2 está amplificado (HER2/CEP 17 > 2,0) y TOP2A no está amplificado (TOP2A/CEP 17 < 2,0) y 1q25 es anómalo (1q25/célula > 3,0 o < 1,5), se considera que el paciente es un muy buen candidato para la terapia con trastuzumab. El Paciente 3 se trató con trastuzumab y mostró una respuesta completa al fármaco por los criterios RECIST.

Tabla 7. Recuentos de señal para el Paciente 4

Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17	Nº célula	1q25
1	10	17	1	1	3
2	5	7	1	2	3
3	7	8	1	3	2
4	11	14	2	4	3
5	14	13	3	5	3
6	9	11	2	6	1
7	12	14	2	7	1
8	11	14	2	8	2
9	12	14	2	9	3
10	12	12	2	10	2
11	13	15	2	11	2
12	12	14	1	12	3
13	11	12	2	13	1
14	12	10	2	14	3
15	13	15	1	15	1
16	17	22	4	16	3
17	15	15	2	17	4
18	20	22	3	18	3
19	12	14	2	19	3
20	11	12	2	20	4
21	6	8	1	21	3

Nº célula	TOP2A	HER2	CEP 17	Nº célula	1q25
22	12	15	2	22	3
23	10	17	3	23	3
24	13	17	2	24	3
25	14	15	3	25	3
26	16	20	2	26	3
27	11	12	1	27	2
28	10	10	1	28	3
29	10	12	1	29	2
30	12	12	1	30	3

Resultados para el Paciente 4: a partir de estos recuentos de señal, se calcularon los promedios de TOP2A/célula, HER2/célula y CEP 17/célula y fueron de 11,8, 13,8, 1,9 y 2,6, respectivamente, proporcionando un valor de 6,3 TOP2A/CEP 17 y 7,4 HER2/CEP 17 para esta muestra de ensayo. Como HER2 está amplificado (HER2/CEP 17 > 2,0) el paciente es un candidato potencial para terapia con trastuzumab, sin embargo, como también está amplificado TOP2A (TOP2A/CEP 17 > 2,0) y 1q25 es normal (1q25/célula < 3,0 y > 1,5) es menos probable que el paciente responda al tratamiento de la misma manera que los pacientes para los que TOP2A no está amplificado y 1q25 es anómalo y deberían considerarse tratamientos alternativos. Se trató al Paciente 4 con trastuzumab y mostró una enfermedad progresiva por criterios RECIST.

Debe entenderse que, aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la siguiente descripción tiene la intención de ilustrar y no limita el alcance de la invención, que está definido por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar un paciente candidato para tratamiento con medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora HER-2, comprendiendo el método:
  - (a) poner en contacto un conjunto de sondas cromosómicas en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas a cromosomas en una muestra biológica del paciente, donde las sondas son capaces de detectar números de copias para HER-2/neu y uno o más de loci genéticos TOP2A, 1q25, PTGS2 y cromosoma 10 en las células y una o más sondas de referencia; y
  - (b) identificar al candidato como adecuado para el tratamiento con medicación que inhibe la capacidad de señalización de la proteína receptora HER-2 a través de la cuantificación de los números de copias para HER-2/neu y uno o más de los loci genéticos TOP2A, 1q25, PTGS2 y cromosoma 10 mediante la hibridación con las sondas.
2. El método de la reivindicación 1, donde el conjunto de sondas comprende sondas capaces de detectar números de copias para HER-2/neu y TOP2A.
3. El método de la reivindicación 1, donde el conjunto de sondas comprende sondas capaces de detectar números de copias para HER-2/neu, TOP2A y uno o más de los loci 1q25 y PTGS2.
4. El método de la reivindicación 1, donde el conjunto de sondas comprende sondas capaces de detectar números de copias para HER-2/neu, TOP2A y 1q25.
5. El método de la reivindicación 1, donde la muestra biológica comprende una biopsia.
6. El método de la reivindicación 1, donde la muestra biológica comprende una muestra de citología.
7. El método de la reivindicación 1, donde las sondas cromosómicas están marcadas de manera fluorescente.
8. El método de la reivindicación 1, donde la muestra biológica comprende células de mama.
9. El método de la reivindicación 8, donde al paciente candidato se le ha diagnosticado cáncer de mama.
10. Un método para identificar un paciente candidato para tratamiento con trastuzumab, comprendiendo el método:
  - (a) poner en contacto un conjunto de sondas cromosómicas en condiciones suficientes para permitir la hibridación de las sondas a cromosomas en una muestra biológica de un paciente, donde las sondas son capaces de detectar números de copias para HER-2/neu y uno o más de TOP2A, 1q25, PTGS2 y cromosoma 10 en las células y una o más sondas de referencia; y
  - (b) identificar al candidato como adecuado para tratamiento con trastuzumab a través de la cuantificación de los números de copias para HER-2/neu y uno o más de los loci genéticos TOP2A, 1q25, PTGS2 y cromosoma 10 mediante la hibridación con las sondas.
11. El método de la reivindicación 10, donde el conjunto de sondas comprende sondas capaces de detectar el número de copias para HER-2/neu y TOP2A y una sonda de referencia capaz de detectar el número de copias del cromosoma 17.
12. Un conjunto de sondas cromosómicas que consisten en sondas capaces de detectar los números de copias de HER-2/neu y dos o más de los loci genéticos 1q25 y PTGS2, cromosoma 10, TOP2A y una o más sondas de referencia.
13. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 12, donde el conjunto de sondas consiste en sondas capaces de detectar los números de copias de HER-2/neu, TOP2A y uno o más de los loci 1q25 y PTGS2.
14. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 12, donde el conjunto de sondas consiste en sondas capaces de detectar el número de copias de HER-2/neu y TOP2A y una sonda adicional capaz de detectar números de copia de los loci genéticos 1q25, PTGS2 y cromosoma 10, y una sonda de referencia capaz de detectar el número de copias del cromosoma 17.
15. El conjunto de sondas cromosómicas de la reivindicación 12, donde el conjunto de sondas consiste en sondas capaces de detectar el número de copias de HER-2/neu, TOP2A y 1q25.
16. Un kit que consiste en sondas cromosómicas capaces de detectar un número de copias de HER-2/neu y dos o más de los loci genéticos 1q25, PTGS2, TOP2A y cromosoma 10 y una o más sondas de referencia.

17. Un kit de la reivindicación 16, donde las sondas cromosómicas consisten en sondas capaces de detectar HER-2/neu y TOP2A y una sonda adicional capaz de detectar números de copias de los loci genéticos 1q25, PTGS2 y cromosoma 10 y una sonda de referencia capaz de detectar el número de copias del cromosoma 17.