

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 519**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2010 E 10732178 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2387717**

54 Título: **Métodos de determinación de la respuesta del paciente por medición de la expresión HER-2**

30 Prioridad:

15.01.2009 US 145029 P

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

13.01.2015

73 Titular/es:

**LABORATORY CORPORATION OF AMERICA
HOLDINGS (100.0%)
430 South Spring Street
Burlington, NC 27215, US**

72 Inventor/es:

**BATES, MICHAEL;
COOK, JENNIFER W.;
DIEDRICH, GUNDO;
GOODMAN, LAURIE;
MUKHERJEE, ALI;
PARRY, GORDON;
SPERINDE, JEFF y
WILLIAMS, STEPHEN JOHN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 526 519 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 determinación de la respuesta del paciente por medición de la expresión HER-2

Campo de la Invención

5 La presente invención proporciona métodos para determinar si es probable que un paciente con cáncer responda al tratamiento con un agente anti-HER2. Los métodos proporcionan el tiempo probable hasta la progresión de una subclase de pacientes HER2 positivos, estratificándolos nuevamente utilizando otro biomarcador, como es la presencia o ausencia de marcadores HER3.

Antecedentes de la Invención

10 Los niveles de expresión de los receptores de superficie celular individuales, como el Her-2, se han utilizado como biomarcadores. Se ha usado el análisis convencional de inmunohistoquímica (IHC) o de hibridación fluorescente in situ (FISH) para detectar la sobreexpresión de Her-2, para determinar si está justificado el tratamiento con un agente anti-Her-2, ej. trastuzumab. La patente EE.UU 4 968 603 describe también la expresión de Her-2 como un biomarcador del cáncer. No obstante, en dos estudios distintos, solamente el 20 o el 35 % de pacientes con sobreexpresión de Her-2 respondieron objetivamente al tratamiento con trastuzumab. Ver Baselga et al, 1996, J. Clin. Oncol.14: 737-44; Cobleigh et al.,1999, J- Clin. Oncol.17: 2639-48; y Vogel et al.,2002, J. Clin Oncol.20: 719-26. Además, en otros estudios sobre la combinación de trastuzumab más quimioterapia en el contexto del cáncer de mama metastásico, solo aproximadamente el 50 % de los pacientes con sobreexpresión de Her-2 respondieron objetivamente a la terapia de combinación con trastuzumab. Ver Slamon et al. N Engl J Med344: 783-92.

20 En el momento actual puede ser problemático determinar si es probable o improbable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un agente anti Her-2, como trastuzumab. Determinar si es probable que tales pacientes respondan a trastuzumab y/u otros agentes anti Her, evitaría suministrar a esos pacientes un tratamiento costoso pero no efectivo. Por ejemplo, puede utilizarse también un ensayo para determinar la sensibilidad del paciente a los agentes anti Her-2, para identificar a pacientes que probablemente no respondan a un agente quimioterapéutico además del agente anti Her-2, permitiendo así al sujeto evitar los potenciales efectos tóxicos del agente quimioterapéutico. También puede utilizarse un ensayo para determinar la sensibilidad del paciente a los agentes anti-Her-2, para predecir el curso temporal de la enfermedad, o la probabilidad de un evento importante en la enfermedad de los pacientes Her-2 positivos. Por tanto, se requiere un método para determinar si un paciente con cáncer va a responder a los agentes anti-Her-2, para maximizar la terapia para el paciente.

Resumen de la Invención

30 La presente invención proporciona métodos para determinar si es probable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, como se especifica en las reivindicaciones anexas. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la presente divulgación comprende métodos para correlacionar los niveles relativos de la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 total (H2T) u homodímeros de Her-2 en una muestra biológica de un sujeto, con un pronóstico sobre la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, comprendiendo: (a) detectar en una muestra biológica del cáncer del sujeto la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2; y (b) correlacionar la cantidad de Her-2 u homodímeros de Her-2 para un pronóstico sobre la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con un agente anti-Her-2.

40 En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona también métodos para la predicción del curso temporal de la enfermedad y/ o la probabilidad de un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad en un sujeto con cáncer, en base a la sensibilidad prevista de un paciente a un agente anti-Her-2. En ciertas realizaciones, los métodos comprenden la detección de un biomarcador o combinación de biomarcadores asociados a la capacidad de respuesta al tratamiento con un agente anti-Her-2, como se describe a continuación, y determinar si es probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden la detección de un biomarcador o combinación de biomarcadores, y la predicción del curso temporal asociado a la progresión de la enfermedad, o la probabilidad de un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad, en un sujeto con cáncer.

45 Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la divulgación comprende métodos para predecir si es probable que un sujeto con cáncer tratado con un agente anti-Her-2 experimente un evento significativo comprendiendo los pasos de: (a) detectar en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2; y (b) correlacionar la cantidad de Her-2 u homodímeros de Her-2 con la probabilidad de que el sujeto experimente un evento significativo.

50 En otros aspectos, la invención se refiere a un método para determinar si es probable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un agente anti-Her-2. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para predecir el curso temporal de la enfermedad. En otro aspecto, el método se refiere a un método para predecir la probabilidad de un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad.

55 En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos, el método comprende la detección en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, y determinar si el Her-2 y/o homodímeros de Her-2 se correlacionan con un nivel bajo o alto de expresión de Her-2.

- En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos, una expresión alta de Her-2 es un $\log_{10}H2T$ (\log_{10} de Her-2 total) \geq aprox. 1,14-1,125. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, la expresión alta de Her-2 comprende una expresión que es muy alta y/o moderadamente alta. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, la expresión muy alta de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq$ aprox. 1,84-2,21. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, una expresión de Her-2 moderadamente alta se sitúa entre un $\log_{10}H2T$ entre aprox. 1,14-1,25 y 1,84-2,21 (es decir, $\geq 1,14-1,25$ y $\leq 1,84-2,21$). O pueden utilizarse otros rangos dependiendo de la cohorte del paciente y/o el evento significativo que se monitoriza. Así, cada uno de los valores umbral y/o rangos umbral que se describen aquí pueden variar en 0,5 unidades log si se describen en una escala \log_{10} , o aproximadamente en un 25 % en una escala lineal o menos (es decir, ser ≤ 25 % mayor y/o ≤ 25 % menor que los rangos específicos divulgados aquí), o en aproximadamente un 20 % o menos, o en aproximadamente un 15 % o menos, o en aproximadamente un 10 % o menos o en aproximadamente un 5 % o menos.
- En determinadas realizaciones, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es alta, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente tenga un curso temporal largo.
- En algunas realizaciones, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presente un curso temporal largo. También en algunas realizaciones, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es muy alta y/o baja, es improbable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presente un curso temporal corto.
- Así, en determinadas realizaciones, si la cantidad de por lo menos uno del Her-2 u homodímeros de Her-2 está por encima de un primer nivel umbral (ej. "alto"), el pronóstico del sujeto es que es probable que responda al agente anti-Her-2. Adicional y/o alternativamente, en determinadas realizaciones, y como se debate aquí en más detalle, si la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 está por encima de un segundo nivel umbral superior al primer nivel umbral (ej. "muy alto"), el pronóstico del sujeto es que es improbable que responda al agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el método se lleva a cabo con un ensayo VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia general, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.
- En determinadas realizaciones, se crea una medida predeterminada dividiendo las muestras de pacientes en por lo menos tres subgrupos de pacientes. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los pacientes se dividen en un subgrupo con expresión de Her-2 baja (es decir, Her-2 total y/o dímeros de Her-2), y un subgrupo con expresión de Her-2 alta. El subgrupo con expresión alta de Her-2 puede ser entonces subdividido en un grupo con expresión de Her-2 muy alta y moderadamente alta. Así, en determinadas realizaciones, el número de subgrupos es de tres, de forma que la muestra de pacientes es dividida en un subgrupo de pacientes cuyos Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es muy alto, un subgrupo cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es bajo, y un subgrupo cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alto. En determinadas realizaciones, la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el sujeto es comparada con el subgrupo alto o el subgrupo bajo; si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal largo.
- Por ejemplo, en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, se crea una medida predeterminada dividiendo una pluralidad de muestras de sujetos en por lo menos tres subgrupos, donde el primer subgrupo comprende muestras con un nivel de Her-2 o homodímeros de Her-2 bajo, comprendiendo el nivel bajo tener una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 igual o por debajo de un primer nivel umbral, y las muestras con una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 igual o por encima del primer umbral, comprenden muestras con un nivel de Her-2 u homodímeros de Her-2 alto, y donde las muestras con un nivel de Her-2 u homodímeros de Her-2 alto son divididas entonces en dos subgrupos, un subgrupo muy alto que comprende muestras con una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 igual o por encima de un segundo nivel umbral superior al primer nivel umbral, y un subgrupo moderadamente alto que comprende las muestras con una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 mayor o igual al primer nivel umbral, e inferior o igual al segundo nivel umbral.
- En cada una de las realizaciones de los métodos, donde se mide Her-2, la expresión de Her-3 puede comprender Her-2, homodímeros de Her-2 o heterodímeros de Her-2. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la cantidad de Her-2 total, homodímeros de Her-2 y/o heterodímeros de Her-2 se mide utilizando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar una cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra.
- En otra realización, el subgrupo cuyos Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alto (es decir, medio) es subdividido a su vez en subgrupos que expresan otro biomarcador. Este otro biomarcador puede ser por lo menos uno de FOXM1, PRAME, Bc12, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TRFC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chkl, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG11, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, Ps2, hENTI, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENTI, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3, CTSB, Her-3 o DIABLO. En determinadas

realizaciones, el otro biomarcador puede ser VEGF, CD31, KDR, p95 o Her3. En otras realizaciones, el biomarcador puede ser Her-3. El marcador adicional puede utilizarse para distinguir más entre los subgrupos Her-2.

En determinadas realizaciones, se crea una medida predeterminada dividiendo las muestras de pacientes con Her-2 moderadamente alto en por lo menos dos subgrupos de pacientes. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es de dos, de forma que la muestra de pacientes es dividida en un subgrupo de pacientes cuya expresión de Her-3 es alta, y otro subgrupo de pacientes cuya expresión de Her-3 es baja.

Así en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos, donde el subgrupo moderadamente alto es dividido nuevamente en base a la expresión de Her-3, un nivel alto comprende tener un Her-3 igual o superior a un primer nivel umbral, y un nivel bajo comprende un Her-3 inferior al primer nivel umbral, donde un sujeto con niveles moderadamente altos de por lo menos un agente de Her-2 y/o dímeros de Her-2, y niveles bajos de Her-3 es probable que responda al agente anti-Her-2, y/o donde un sujeto con niveles moderadamente altos de por lo menos un agente de Her-2 y/o dímeros de Her-2 y niveles altos de Her-3 es improbable o menos probable que responda al agente anti-Her-2.

Cuando se mide Her-3, la expresión de Her-3 puede comprender Her-3, homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-3. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la cantidad total de Her-3, homodímeros de Her-3 y/o heterodímeros de Her-3 (ej. Her2/Her-3) se mide utilizando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar una cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra.

Por ejemplo, en una realización el punto de corte para una expresión alta de Her3 (en comparación con la expresión baja de Her3 es 0,158). O se pueden utilizar valores aproximadamente un 25 % más bajos y/o un 25 % superiores. Así, cada uno de los valores umbral y/o rangos umbral descritos aquí pueden variar en aproximadamente 0,5 unidades log para una escala log10, y/o un 25 % en una escala lineal o menos (es decir, ser $\leq 25\%$ mayores y/o $\leq 25\%$ menores que los rangos específicos divulgados aquí), o en aproximadamente un 20 % o menos, o en aproximadamente un 15 % o menos, o en aproximadamente un 10 % o menos, o en aproximadamente un 5 % o menos.

El valor real de un corte alto de Her3 frente a uno bajo puede variar dependiendo de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se monitorice. En determinadas realizaciones el número de subgrupos es mayor de tres, incluyendo sin limitación, cuatro subgrupos, cinco subgrupos y seis subgrupos. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta. En determinadas realizaciones preferidas, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si es probable que un sujeto con un cáncer Her-2 positivo responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o el curso temporal de la enfermedad sea largo. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la predicción del curso temporal de la enfermedad en un sujeto con un cáncer Her-2 positivo. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para predecir la probabilidad de un evento significativo en un sujeto con un cáncer Her-2 positivo.

Así, en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados, el método comprende la medición en una muestra biológica del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta, y la expresión de Her-3 es baja, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presente un largo curso temporal. En determinadas realizaciones, el método comprende la medición de una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta y la expresión de Her-3 es alta, es improbable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de Her-2. En determinadas realizaciones se mide la cantidad de homodímeros de Her-2. Por ejemplo, en determinadas realizaciones se correlaciona el nivel de Her-2 total con el nivel de homodímeros de Her-2, de forma que la medición de cualquiera de ellos proporciona las mismas indicaciones de pronóstico (es decir, si un paciente va a responder a un agente anti-Her-2). En determinadas realizaciones, la cantidad de homodímeros de Her-2 se mide empleando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar la cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra. En determinadas realizaciones, el ensayo es el VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para determinar si es improbable que un sujeto con cáncer Her-2 positivo responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un corto curso temporal. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 es baja, es improbable que el sujeto responda al tratamiento con el agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones preferidas, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si es improbable que un sujeto con un cáncer Her-2 positivo responda al tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones, el método comprende la medición en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si el nivel de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es alto y/o muy alto, es improbable que el paciente responda por lo menos a un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2.

En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, es cáncer de mama metastásico. En otras realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones el agente quimioterapéutico es paclitaxel. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de Her-2 total. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de homodímeros de Her-2. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de homodímeros de Her-2 utilizando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar una cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra. En determinada realización, el ensayo es el VERATAG®. En determinadas realizaciones se mide la probabilidad de respuesta respecto al índice de supervivencia global, tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.

Y aún en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit para medir Her-2 e instrucciones para correlacionar la expresión de Her-2 con la probabilidad de que un paciente responda al tratamiento con un agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona también kits para la predicción del curso temporal de la enfermedad, y/o de la probabilidad de un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad, en un sujeto con cáncer, en base a la sensibilidad prevista de un paciente a un agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el kit comprende reactivos para medir marcadores adicionales. El otro biomarcador puede ser por lo menos uno de FOXM1, PRAME, Bc12, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TRFC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chkl, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG11, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, Ps2, hENTI, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENTI, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3, CTSB, Her-3 o DIABLO. En determinadas realizaciones, el otro biomarcador puede ser VEGF, CD31, KDR, p95 o Her3.

En otros aspectos de cada una de las realizaciones divulgadas aquí, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto con cáncer. En un aspecto, los métodos comprenden determinar si el sujeto padece un cáncer que es probable que responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o tiene un curso temporal largo, de acuerdo con un método de la invención, y la administración de una cantidad efectiva de un agente anti-Her-2 al sujeto, como resultado de la mencionada determinación. En otro aspecto, los métodos comprenden determinar si un sujeto sufre un cáncer que es probable que responda al tratamiento con un agente anti-Her-2 según un método de la invención, aconsejando luego a un profesional médico sobre la opción de tratamiento de administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente anti-Her-2. En otro aspecto, los métodos comprenden determinar que un sujeto sufre un cáncer que tiene un curso temporal corto y/o es improbable que responda a un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es paclitaxel. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico.

Breve Descripción de las Figuras

La presente invención puede entenderse mejor por referencia a las siguientes figuras no limitantes.

La Figura 1 muestra un esquema de un ensayo FFPE VERATAG® de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 2 A y la Figura 2B muestran una reacción VERATAG® donde el oxígeno singlete reactivo difundido escinde el enlazador covalente entre una molécula marcadora VERATAG® y un anticuerpo de acuerdo con realizaciones alternativas de la presente invención.

La Figura 3 muestra electroferogramas representativos de la señal VERATAG® generada para cuatro líneas celulares de cáncer de mama bien caracterizadas, junto con una micrografía Her-2 IHC paralela. El lado izquierdo del gráfico indica la línea celular, el centro el electroferograma correspondiente, y el lado derecho el IHC correspondiente de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4 muestra el tiempo hasta la progresión (TTP) de todos los pacientes Her-2 positivos, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5 muestra el TTP de los pacientes que son Her-2 negativos o positivos, determinado por la detección FISH de la amplificación del gen Her-2, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 6 muestra el TTP de los pacientes con expresión baja de Her-2, que no responden al tratamiento con trastuzumab, con independencia de la categorización por medición FISH de la amplificación génica, de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 7 muestra, de acuerdo con una realización de la presente invención, el TTP de los pacientes con una expresión muy alta de Her-2, ($H2T \geq 1,84$) y/o expresores Her-2 bajos ($H2T < 1,14$, con independencia de FISH), que no responden al tratamiento con trastuzumab, así como también a los pacientes con niveles moderadamente altos ($H2T$ entre 1,14 y 1,84) de expresión de Her-2.

- 5 La Figura 8 muestra, de acuerdo con una realización de la presente invención, el TTP de los pacientes que tienen cantidades moderadamente altas de Her-2, y que son positivos según se determina por FISH, pueden ser posteriormente estratificados por la sobreexpresión de Her-3 (H3Thi) o la subexpresión (H3Tlo), donde la subexpresión de Her-3 va asociada a una mayor capacidad de respuesta al tratamiento con trastuzumab, en comparación con la sobreexpresión de Her-3.
- 10 La Figura 9 muestra un estudio de muestras Her-2 positivas de estadio precoz primario (es decir, adyuvante), según una realización de la presente invención, donde el Panel B demuestra que los pacientes CISH positivos, con muy alto H2T VERATAG®, con un corte de $H2T > 2,21$, demuestran un escaso beneficio de la adición de trastuzumab a la quimioterapia, en comparación con muestras con Her-2 que no sea muy alto, como se muestra en el Panel A.

Descripción Detallada de la Invención

- 15 Tal como se aplican aquí, los términos “realización” y “aspecto” son intercambiables. El término “aproximadamente”, tal como se utiliza aquí, y a menos que se indique lo contrario, se refiere a un valor no superior al 10 % por encima o por debajo del valor que modifica el término. Por ejemplo, el término “aproximadamente 5 μ /kg” significa un rango de 4,5 μ /kg a 5,5 μ /kg. En otro ejemplo, “aproximadamente 1 hora” significa un rango de 48 a 72 minutos.

- 20 “Anticuerpo” significa una inmunoglobulina que se liga específicamente, y por ello se define como complementaria de una organización espacial y polar de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante, y puede ser preparado mediante técnicas que son bien conocidas en el sector, tales como la inmunización de un huésped y recogida de sueros (policlonales), o preparando líneas celulares híbridas continuas, y recogiendo la proteína (monoclonal) segregada, o clonando y expresando secuencias nucleóticas o versiones mutagenizadas de las mismas, codificando por lo menos las secuencias de aminoácidos requeridas para la unión específica de anticuerpos naturales. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento, cuyas inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de ellas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab' y semejantes. Los anticuerpos pueden ser también de cadena simple, o un fragmento de ellos ligado a antígeno, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o cualquier otro derivado de anticuerpo conocido por un experto en la técnica, que conserve actividad ligante específica para un punto de unión concreto. Además, pueden utilizarse cuando sea apropiado agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos, siempre que se mantenga la afinidad de unión para un punto de unión determinado. Se puede encontrar orientación sobre la producción y selección de anticuerpos y derivados de anticuerpos, incluyendo ensayos que utilicen etiqueta molecular liberable (como se describe más abajo), en textos y manuales disponibles, ej. Harlos and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York; Howard and Bethell, 2001, Basic Methods in Antibody Production and Characterization, CRC Press; Wild, ed., 1994, The Immunoassay Handbook, Stockton Press, Nueva York.
- 35

- 40 “Composición ligante de anticuerpos”, significa una molécula o un complejo de moléculas que comprende uno o más anticuerpos, o fragmentos ligantes de antígenos que se ligan a una molécula, y derivan su especificidad de unión de tal anticuerpo o fragmento ligante de anticuerpo. Las composiciones ligantes de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, (i) pares de anticuerpos en los que un primer anticuerpo se liga específicamente a una molécula diana, y un segundo anticuerpo se liga específicamente a una región constante del primer anticuerpo; un anticuerpo biotinilado que se liga específicamente a una molécula diana y una proteína estreptavidina, cuya proteína es derivatizada con fracciones tales como etiquetas moleculares, fotosensibilizadores o similares, a través de una fracción biotina; (ii) anticuerpos específicos para una molécula diana y conjugados a un polímero como dextrano, que a su vez es derivatizado con fracciones tales como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores, directamente por enlace covalente, o indirectamente a través de enlaces estreptavidina-biotina; (iii) anticuerpos específicos para una molécula diana y conjugados a una perla, o microperla, u otro soporte de fase sólida, que a su vez es derivatizado directa o indirectamente con fracciones tales como etiquetas moleculares o fotosensibilizadores, o polímeros conteniendo estos últimos.
- 45

- 50 “Determinante antigénico” o “epitopo” significa un punto en la superficie de una molécula, habitualmente una proteína, al que se liga una molécula de anticuerpo individual. Generalmente, una proteína tiene varios o muchos determinantes antigénicos distintos, y reacciona con anticuerpos de distintas especificidades. Un determinante antigénico preferido es un punto de fosforilación de una proteína.

- 55 “Compuesto ligante” se referirá a una composición que liga anticuerpos, un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de ligarse específicamente a una proteína, molécula o formación compleja estable diana, con un analito de interés, como un complejo de proteínas. En un aspecto, un compuesto ligante, que puede ser representado por la fórmula más abajo, comprende una o más etiquetas moleculares sujetas a una fracción ligante.

- 5 “Fracción ligante” significatoda molécula a la que se pueden fijar, directa o indirectamente, etiquetas moleculares, que es capaz de ligarse específicamente a un analito. Las fracciones ligantes incluyen, pero sin limitación, anticuerpos, composiciones ligantes de anticuerpo, péptidos, proteínas, ácidos nucleídos y moléculas orgánicas con un peso molecular de hasta unos 1000 Dalton, y conteniendo átomos seleccionados del grupo consistente en hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. De preferencia, las fracciones ligantes son anticuerpos o composiciones ligantes de anticuerpos.
- 10 “Cáncer” y “canceroso” se refiere a o describe el organismo de condición fisiológica, incluyendo mamíferos, que se caracteriza típicamente por un desordenado crecimiento celular. Los ejemplos de cáncer comprenden, pero sin limitación, el carcinoma, el linfoma, el blastema, el sarcoma y la leucemia. Ejemplos más específicos de tales cánceres son el cáncer de célula escamosa, el cáncer de pulmón, ej., cáncer de pulmón de célula pequeña o cáncer de pulmón de célula no pequeña, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de glándula salival, el cáncer de riñón, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.
- 15 “Agente quimioterapéutico” significa una sustancia química, básicamente un agente citotóxico o citostático, utilizado para tratar una afección, especialmente un cáncer. Los agentes quimioterapéuticos incluirán compuestos tales como paclitaxel, como se expone aquí. Un “enlace escindible”, como se utiliza aquí, se refiere a un grupo de enlace químico que puede ser escindido en condiciones que no degraden la estructura, o afecten a las características de detección de una etiqueta molecular conectada a una fracción ligante con el enlace escindible.
- 20 Una “fracción inductora de escisión” o “agente de escisión”, como se utiliza aquí, es un grupo que produce una especie activa que es capaz de escindir un enlace escindible, preferentemente por oxidación. De preferencia, la especie activa es una especie química que demuestra una actividad de corta duración, de forma que sus efectos de inducción de escisión se dan solamente en la proximidad del punto de su generación.
- 25 Una “sonda de escisión”, como se utiliza aquí, se refiere a un reactivo que comprende una fracción inductora de escisión, como se define aquí, y una composición ligante de anticuerpos, un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, como la biotina o la estreptavidina, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse específicamente a una proteína o molécula diana, o formación de complejo estable con un analito de interés, como un complejo de proteínas.
- 30 “VERATAG®”, “VERATAG®” y “ensayo VERATAG®” se utilizan indistintamente y se refieren a ensayos simples y multiplexados, y ensayos multi-etiqueta, materiales, métodos y técnicas para realizar y utilizar tales ensayos, incluyendo, pero sin limitación, reactivos, procedimientos analíticos y software relacionados con esos ensayos. Tales ensayos se divulgan en esta solicitud, así como en la patente EE.UU 7 105 308.
- 35 “FFPE” se refiere a un grupo de células o cantidad de tejido fijados, en especial muestras convencionales incrustadas en parafina y fijadas con formalina. Tales muestras son utilizadas típicamente, pero sin limitación, en un ensayo de complejos de receptores, en forma de finas secciones, ej. 3-10 μm de grosor, de tejido fijado montado en un portaobjetos de microscopio o superficie equivalente. Tales muestras son sometidas también típicamente a un procedimiento de rehidratación convencional, y opcionalmente a un procedimiento de recuperación de antígeno como parte de, o de forma preliminar a las mediciones del ensayo.
- 40 “Cociente de riesgo”, como se utiliza aquí, se refiere a un método estadístico utilizado para generar una estimación de riesgo relativo. El “cociente de riesgo” es la razón existente entre el riesgo previsto de un grupo frente a otro grupo. Por ejemplo, poblaciones de pacientes tratadas con versus sin un agente anti-Her-2 pueden ser evaluadas sobre si el agente anti-Her-2 es o no efectivo para prolongar el tiempo hasta la recurrencia a distancia de la enfermedad. El cociente de riesgo puede ser entonces comparado con una medida independiente, como el cociente homodímeros de Her-2 / Her-2 total. En los cocientes homodímero de Her-2 / Her-2 total, en los que el cociente de riesgo es menor que uno, tratar con un agente anti-Her-2 tiene mayores posibilidades de eficacia. En los cocientes homodímero de Her-2 / Her-2 total en los que el cociente de riesgo no es distinto de uno, el tratamiento con un agente anti-Her-2 tiene una menor probabilidad de eficacia.
- 45 “Her-2”, “ErbB2”, “c-Erb-B2”, “HER2”, “Her2” y “neu” se utilizan indistintamente aquí, y se refieren a Her-2 nativo, y variantes alélicas del mismo, como se describe, por ejemplo, en Semba et al., 1985, P.N.A.S. EE.UU 82: 6497-650, y Yamamoto et al., 1986, Nature 319: 230-234 y número de acceso Genebank X03363. A menos que se indique lo contrario, los términos “Her-2”, “ErbB2”, “c-Erb-B2”, “HER2” y “Her-2” cuando se usan aquí, se refieren a la proteína humana. Al gen que codifica Her2 se hace referencia aquí como “erbB2”. Como se utiliza aquí, H2T se refiere a la expresión de Her-2 total como se muestra, por ejemplo, pero sin limitación, con VERATAG®.
- 50 “Agente anti-Her-2”, como se utiliza aquí, se refiere a un compuesto que puede inhibir una actividad biológica de Her-2, o una célula que expresa Her-2, o una célula cancerosa Her-2 positiva. Tales actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, la dimerización, la autofosforilación, la fosforilación de otro receptor, la transducción de señal y semejantes. Las actividades biológicas pueden incluir, sin limitación, la supervivencia celular y la proliferación celular, y la inhibición de tales actividades por un agente anti-Her-2 puede ser la muerte celular directa o indirecta
- 60

(ej. ADCC), la disrupción de complejos proteicos o la formación de complejos, la modulación del tráfico de proteínas o la inhibición enzimática. Las actividades biológicas pueden incluir también la respuesta del paciente, como se indica en esta solicitud. Ejemplos de agentes anti-Her-2 incluyen, pero sin limitación, las grandes moléculas 4D5 y trastuzumab, y moléculas pequeñas como AEE-788 y lapatinib. “Homodímero de Her-2”, en referencia a los receptores de membrana Her-2 de superficie celular significa un complejo de dos o más proteínas Her-2 unidas a la membrana. Los dímeros consisten habitualmente en dos receptores en contacto entre sí. Los dímeros pueden ser creados en una membrana de superficie celular por procesos pasivos, como las interacciones de Van der Waal y semejantes, o pueden crearse por procesos activos, como la dimerización inducida por ligando, enlaces covalentes, interacción con componentes intracelulares y similares. Ver, ej., Schlessinger, 2000, Cell103: 211-225. Como se utiliza aquí, el término “dímero” se entiende que se refiere a un “dímero receptor de membrana de superficie celular”, a menos que se entienda lo contrario por el contexto. Como se utiliza aquí, H22D se refiere a un dímero cuantificado como se muestra, por ejemplo pero sin limitación, por VERATAG®.

El “cociente homodímero de Her-2 /Her-2 total” se refiere a una medida que describe la cantidad de homodímeros de Her-2 dividida por la cantidad total de Her-2 en una muestra procedente de un tejido de un sujeto, según cualquier método cuantitativo individual disponible para un experto en la técnica.

Un cáncer, célula cancerosa, sujeto o paciente “Her-2 positivo”, se refiere a un cáncer, célula, sujeto o paciente que presente una puntuación de cómo mínimo 2 al emplear un HercepTest® (DakoCytomation California Inc., Carpinteria, CA), o un cáncer, célula cancerosa, sujeto o paciente que haya sido identificado como tal por FISH. En determinadas realizaciones, la célula Her-2 positiva presenta una puntuación de cómo mínimo 2+ o 3+ utilizando el HercepTest®.

“Alto” se refiere a una medida que es superior a la normal, mayor que un estándar como una medida predeterminada o una medida de subgrupo, o que es relativamente superior a otra medida de subgrupo. Por ejemplo, Her-2 alto se refiere a una medida de Her-2 que es superior a una medida de Her-2 normal. Una medida de Her-2 normal puede determinarse según cualquier método disponible para un experto en la técnica. Her-2 alto puede referirse también a una medida que sea igual a o superior a una medida predeterminada, como un punto de corte predeterminado. Her-2 alto puede referirse también a una medida de Her-2 donde un subgrupo con Her-2 alto tiene niveles relativamente mayores de Her-2 que otro subgrupo. Por ejemplo, pero sin limitación, de acuerdo con la presente especificación, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos dividiendo las muestras en torno a un punto determinado matemáticamente, tal como, pero sin limitación, una media, creando así un subgrupo cuya medida es alta (es decir, más alta que la media), y otro subgrupo cuya medida es baja. Her-2 puede ser medido por cualquier método conocido por un experto en la técnica, como por ejemplo, pero sin limitación, utilizando VERATAG® o cualquier método estándar inmunohistoquímico (IHC), como HercepTest®. En otro ejemplo, homodímeros de Her-2 altos se refiere a una medida de homodímeros de Her-2 que es superior a una medida normal de homodímeros de Her-2 en un conjunto determinado de muestras o pacientes que son Her-2 positivos. Una medida normal de homodímeros de Her-2 puede ser determinada mediante cualquier método disponible para un experto en la técnica. Homodímeros de Her-2 altos puede referirse también a una medida que sea superior a una medida predeterminada, como un punto de corte predeterminado. Homodímeros de Her-2 altos puede referirse también a una medida de homodímeros de Her-2 donde un subgrupo con homodímeros de Her-2 altos tiene un nivel de homodímeros de Her-2 relativamente superior al de otro subgrupo. Los homodímeros de Her-2 pueden medirse por cualquier método conocido, tal como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), la transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), ensayo de ligadura de proximidad (PLA), anticuerpos específicos de dímeros o VERATAG® o cualquier otro método que sea bien conocido por un experto en la técnica. Como otro ejemplo, un cociente alto homodímeros de Her-2 / Her-2 total puede referirse a uno o más subgrupos de cocientes homodímeros de Her-2 / Her-2 total que tengan medidas superiores a las de subgrupos de cociente intermedio o bajo. Los cocientes altos homodímeros de Her-2 / Her-2 total pueden determinarse según cualquier método cuantitativo individual disponible para un experto en la técnica. En algunos casos un nivel “alto” de expresión puede comprender un rango de expresión que sea muy alto, y un rango de expresión que sea “moderadamente alto”, donde moderadamente alto es un nivel de expresión superior al normal, pero inferior a “muy alto”. Se dan aquí ejemplos de rangos de expresión alta de Her-2 (incluyendo muy alta y moderadamente alta).

“Moderadamente alto”, “medio” o “intermedio”, como se utilizan aquí, se refieren a una medida que es superior a “bajo” e inferior a muy “alto”. Por ejemplo, “intermedio” puede usarse para describir un o más de por lo menos 3 subgrupos que caigan en el rango medio de medidas de cocientes homodímeros de Her-2/ Her-2 total.

“Probable”, como se usa aquí, se refiere a un incremento de la probabilidad de que se produzca un punto objeto, cosa o persona. Así, por ejemplo, un sujeto que es probable que responda al tratamiento con trastuzumab tiene una mayor probabilidad de responder al tratamiento con trastuzumab respecto a un sujeto o grupo de sujetos de referencia.

“Largo”, como se utiliza aquí, se refiere a una medida de tiempo que es superior a la normal, mayor que un estándar que sea una medida predeterminada, o la medida de un subgrupo que es relativamente más larga que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, respecto a la longevidad de un paciente, una progresión larga se refiere a un tiempo de progresión que es más largo que un tiempo de progresión normal. Que un tiempo de progresión sea largo o no puede determinarse por cualquier método disponible para un experto en la técnica. Largo puede incluir, por ejemplo,

ausencia de progresión. En una realización, “largo” se refiere a un tiempo que es superior a la media de curso temporal requerida para que se produzca un evento significativo en una enfermedad.

“Bajo” es un término que se refiere a una medida inferior a la normal, menor que un estándar que sea una medida predeterminada o una medida de un subgrupo que es relativamente inferior a la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, Her-2 bajo significa una media de Her-2 que es inferior a una medida normal de Her-2 en un conjunto determinado de muestras de pacientes que sean Her-2 positivos. Una medida normal de Her-2 puede determinarse mediante cualquier método disponible para un experto en la técnica. Her-2 bajo puede significar también un método que es inferior a una medida predeterminada, como un punto de corte predeterminado. Her-2 bajo puede significar también una medida donde un subgrupo con Her-2 bajo es relativamente inferior a otro subgrupo. Por ejemplo, pero sin limitación, según la presente especificación, pueden crearse dos subgrupos de pacientes distintos, dividiendo las muestras en torno a un punto determinado matemáticamente, tal como, pero sin limitación, una media, creando así un grupo cuya medida es baja (es decir menor que la media) con respecto a otro grupo cuya medida es alta. Her-2 puede medirse por cualquier método conocido por un experto en la técnica, como, por ejemplo pero sin limitación, utilizando el método VERATAG®, o cualquier otro método inmunohistoquímico (IHC) estándar, como HercepTest®. Como otro ejemplo, homodímeros de Her-2 bajos significa una medida de homodímeros de Her-2 que es inferior a una medida normal de homodímeros de Her-2 en un conjunto concreto de muestras o pacientes Her-2 positivos. Homodímeros de Her-2 bajos puede significar también una medida que es inferior a una medida predeterminada, como puede ser un punto de corte predeterminado. Homodímeros de Her-2 bajos puede significar también una medida donde un subgrupo de homodímeros de Her-2 bajos es relativamente inferior a otro subgrupo. Los homodímeros de Her-2 pueden medirse por cualquier método conocido como la transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET), transferencia de energía por resonancia bioluminiscente (BRET), ensayo de ligadura de proximidad (PLA), anticuerpos específicos de dímeros o VERATAG®, o cualquier otro método que sea bien conocido por un experto en la técnica. Como otro ejemplo, un cociente bajo homodímeros de Her-2 / Her-2 total puede referirse a uno o más subgrupos de cocientes homodímeros de Her-2 / Her-2 total que tengan medidas inferiores a los subgrupos de cociente intermedio o alto. Los cocientes bajos homodímeros de Her-2 / Her-2 total pueden determinarse mediante cualquier método cuantitativo individual disponible para un experto en la técnica. Se presentan aquí rangos de ejemplo de valores bajos de la expresión Her-2

Una “etiqueta molecular”, como se utiliza aquí, se refiere a una molécula que puede distinguirse de otras moléculas, en base a una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se separan, incluyendo pero sin limitación, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, la solubilidad, pKa, la hidrofobicidad, la carga, el cociente carga/ masa, la polaridad o similares. En un aspecto, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto difieren en características de movilidad electroforética y detección óptica, y pueden ser separadas por electroforesis. En otro aspecto, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto pueden diferir en el peso molecular, forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, polaridad y pueden ser separadas por HPLC de fase normal o inversa, HPLC de intercambio iónico, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas, cromatografía de fase gaseosa o técnicas semejantes.

“Punto de corte óptimo”, como se utiliza aquí, se refiere al valor de una medida predeterminada en sujetos que presentan determinados atributos que permiten la mejor discriminación entre dos categorías de un atributo. Por ejemplo, hallar un valor para un punto de corte óptimo que permite la mejor discriminación entre dos categorías, expresión de H2T alta y expresión de H2T baja, para la determinación de OS. Los puntos de corte óptimos se utilizan para separar los sujetos con valores inferiores o superiores al punto de corte óptimo, para optimizar el modelo de predicción, por ejemplo, pero sin limitación, maximizar la especificidad del modelo, maximizar la sensibilidad del modelo, maximizar la diferencia en resultado, o minimizar el valor p del cociente de riesgo o una diferencia en respuesta.

“Supervivencia global” u “OS” se refiere al tiempo medido desde el inicio del tratamiento hasta la defunción o censura. La censura puede resultar de la finalización de un estudio o del cambio de tratamiento. La supervivencia global puede referirse a una probabilidad, como por ejemplo, a la probabilidad representada en un gráfico de Kaplan-Meier de seguir vivo en un tiempo determinado, siendo éste el tiempo transcurrido entre el inicio del tratamiento hasta la defunción o censura.

“Fotosensibilizador” significará una molécula que absorbe la luz, que cuando se activa por la luz convierte el oxígeno molecular en oxígeno singlete.

“RECIST” es un acrónimo que significa “Response Evaluation Criteria in Solid Tumours” (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos), y es un conjunto de reglas publicadas que definen cuándo mejoran los pacientes con cáncer (“responden”), se mantienen igual (“estables”) o empeoran (“progresión”) durante los tratamientos. La respuesta definida por los criterios RECIST ha sido publicada por ejemplo, en el Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, N° 3, febrero 2, 2000, y los criterios RECIST pueden incluir otras definiciones y conjuntos de reglas similares publicados. Un experto en la técnica entendería definiciones que corresponden a los criterios RECIST, como se usan aquí, tales como “PR”, “CR”, “SD” y “PD”.

“Unidades de fluorescencia relativa” o “RFUs” se utilizan indistintamente y se refieren al tiempo integral de un pico de electroforesis capilar determinado, utilizando unidades de fluorescencia arbitrarias, en comparación con un estándar. Respecto a VERATAG®, la RFU es proporcional a la concentración de VERATAG® inyectada en

electroforesis capilar con alguna variabilidad esperada introducida, por ejemplo, por inyección y diferencias capilares.

“Área de pico relativa” o “RPA” se utilizan indistintamente y se refieren al cociente entre una RFU de un VERATAG® determinada, y una RFU de un estándar de fluorescencia interno conocido de concentración constante y conocida.

5 “Respuesta” y “responder” al tratamiento, y otras formas de este verbo, como se utilizan aquí, se refieren a la reacción de un sujeto al tratamiento con un agente anti-Her-2. Por ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente anti-Her-2 si el crecimiento de un tumor en el sujeto se retrasa aproximadamente un 10, 20, 30, 40, 50, 60
10 70, 80, 90 % o más. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente anti-Her-2 si el tumor del sujeto se contrae aproximadamente un 5, 10, 20 30, 40, 50 % o más, determinado por una medida adecuada, ej. por masa o volumen. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente anti-Her-2 si el sujeto experimenta una esperanza de vida ampliada en aproximadamente un 5, 10, 20, 30, 40, 50 % o más, más allá de la esperanza de vida prevista de no administrarse tratamiento. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente anti-Her-2 si el sujeto experimenta un incremento en la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia global o un aumento del tiempo hasta la progresión. Pueden utilizarse diversos métodos para
15 determinar si un paciente responde a un tratamiento, incluyendo los criterios RECIST, como se indica más arriba.

“Muestra” o “muestra de tejido” o “muestra de paciente” o “muestra de tejido o células del paciente” o “espécimen” se refieren a la recogida de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. El origen de la muestra de tejido puede ser tejido sólido, procedente de un órgano fresco, congelado y/o conservado, o muestra de tejido, biopsia o aspirado; sangre o cualquier componente de la sangre; fluidos corporales, tales como líquido
20 cerebroespinal, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; o células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no estén entremezclados naturalmente con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. Las células pueden fijarse de forma convencional, como en un FFPE.

“Corto”, como se utiliza aquí, se refiere a una medida de tiempo que es más corta de lo normal, más corta que un estándar, como puede ser una medida predeterminada, o una medida de subgrupo que es relativamente más corta que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, respecto a la longevidad de un paciente, una progresión corta se refiere a un tiempo de progresión que es más corto que un tiempo normal de progresión. Que un tiempo de progresión sea corto o no puede ser determinado de acuerdo con cualquier método disponible para un experto en la técnica. En una realización, “corto” se refiere a un tiempo que es inferior a la media de curso temporal requerida para que se produzca un evento significativo en una enfermedad. Como se utiliza aquí, “evento significativo” se referirá a un evento en la enfermedad de un paciente que es importante, tal como lo determine un experto en la técnica. Ejemplos de eventos significativos incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, diagnóstico primario, defunción, recurrencia, la determinación de que la enfermedad de un paciente es metastásica, la recidiva de la enfermedad de un paciente, o la progresión de la enfermedad de un paciente desde cualquiera de los estadios señalados más arriba
30 a otro. Un evento significativo puede ser cualquier evento importante utilizado para evaluar OS, TTP y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta, según determine un experto en la técnica.

Tal como se emplean aquí, los términos “sujeto” y “paciente” se utilizan indistintamente. Como se usan aquí, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, de preferencia un mamífero, incluyendo un no primate (ej., una vaca, cerdo, caballo, burro, cabra, camello, gato, perro, cobaya, rata, ratón, oveja), y un primate (ej., un mono, tal como un mono cynomolgous, gorila, chimpancé y un humano).
40

Como se utiliza aquí, “curso temporal” se refiere al intervalo de tiempo transcurrido entre un evento inicial y uno posterior. Por ejemplo, con respecto al cáncer de un paciente, el curso temporal puede estar relacionado con la enfermedad de un paciente, y puede medirse calibrando eventos significativos en el curso de la enfermedad, en el que el primer evento puede ser el diagnóstico, y el posterior evento la metástasis, por ejemplo.

45 “Tiempo hasta la progresión” o “TTP” se refiere a un tiempo medido desde el inicio del tratamiento, hasta la progresión, o un cáncer o censura. La censura puede ser originada por el final de un estudio, o un cambio en el tratamiento. El tiempo hasta la progresión puede representarse también como una probabilidad, como por ejemplo, en un gráfico Kaplein-Meier, donde el tiempo hasta la progresión puede representar la probabilidad de estar libre de progresión durante un tiempo determinado, siendo este tiempo el transcurrido entre el inicio del tratamiento hasta la progresión o censura.
50

“Tratar”, “tratamiento”, y otras formas de esta palabra se refieren a la administración de un agente anti-Her-2, para impedir el crecimiento de un cáncer, provocar la reducción de un cáncer en peso o volumen, ampliar el tiempo de supervivencia esperado del sujeto, y o el tiempo hasta la progresión del tumor o similares.

55 “Improbable” se refiere a una menor probabilidad de que un evento, punto, objeto, cosa o persona se produzca con respecto a una referencia. Así, un sujeto que es improbable que responda al tratamiento con paclitaxel además de trastuzumab tiene una menor probabilidad de responder al tratamiento con paclitaxel y trastuzumab en relación con un sujeto o grupo de sujetos de referencia.

60 Así, realizaciones de la invención proporcionan métodos para determinar si un sujeto con cáncer es probable que responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o predecir el curso temporal de la enfermedad y/o la probabilidad de un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad en un sujeto con cáncer. En

determinadas realizaciones, el método comprende la detección de un biomarcador o combinación de biomarcadores asociados a la respuesta al tratamiento con un agente anti-Her-2 como se describe aquí, y determinar si es probable que el sujeto responda al tratamiento con el agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, los métodos comprenden la detección de un biomarcador o combinación de biomarcadores, y predecir el curso temporal asociado a la progresión de la enfermedad o la probabilidad de que se produzca un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad en un sujeto con cáncer.

En un aspecto, la invención se refiere a un método para determinar si un sujeto con cáncer es probable que responda al tratamiento con un agente anti-Her-2. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para predecir el curso temporal de la enfermedad. En otro aspecto, el método se refiere a un método para predecir la probabilidad de que se registre un evento significativo en el curso temporal de la enfermedad.

En determinadas realizaciones, se mide el curso temporal determinando el tiempo transcurrido entre eventos significativos en el curso de la enfermedad de un paciente, donde la medición es predictiva de si un paciente tendrá un largo curso temporal. Por ejemplo, en una realización preferida, el evento significativo es la progresión desde el diagnóstico primario hasta la defunción. En una realización preferida, el evento significativo es la progresión desde el diagnóstico primario a enfermedad metastásica. En una realización preferida, el evento significativo es la progresión desde el diagnóstico primario a la recidiva. En una realización preferida, el evento significativo es la progresión desde la enfermedad metastásica a la defunción. En una realización preferida, el evento significativo es la progresión desde la enfermedad metastásica a la recidiva. En una realización preferida, el evento significativo es la progresión desde la recidiva a la defunción. En determinadas realizaciones, el curso temporal se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.

En determinadas realizaciones, el método comprende la detección en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es alta, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o que el paciente tenga un curso temporal largo.

Así, en determinadas realizaciones, la divulgación comprende métodos de correlación de los niveles relativos de la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 en una muestra biológica procedente de un sujeto, con un pronóstico sobre la probabilidad de que el sujeto vaya a responder al tratamiento con un agente anti-Her-2, comprendiendo: (a) detectar en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2; y (b) correlacionar a cantidad de Her-2 u homodímeros de Her-2 con un pronóstico sobre la probabilidad de que el sujeto vaya a responder al tratamiento con un agente anti-Her-2.

En determinadas realizaciones, si la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 es igual o superior a un primer nivel umbral, el pronóstico del sujeto es que es probable que responda al agente anti-Her-2. Adicional y/o alternativamente, si la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 es igual o superior a un segundo nivel umbral superior al primer nivel umbral, el pronóstico del sujeto es que resulta improbable que responda al agente anti-Her-2.

También, en determinadas realizaciones, se crea una medida predeterminada dividiendo una pluralidad de muestras de sujetos en por lo menos tres subgrupos, donde el primer subgrupo comprende muestras que tengan Her-2 u homodímeros de Her-2 a un nivel bajo, y ese nivel bajo comprende presentar una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 que es igual o inferior a un primer nivel umbral, y las muestras presenten una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 igual o superior al primer umbral, y donde las muestras que presenten un alto nivel de Her-2 u homodímeros de Her-2 se dividen en dos subgrupos, un subgrupo muy alto, comprendiendo muestras con una cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 igual o superior a un segundo nivel umbral superior al primer nivel umbral, y un subgrupo moderadamente alto comprendiendo muestras con una cantidad de por lo menos uno de Her-2 u homodímeros de Her-2 superior o igual al primer nivel umbral, e inferior o igual al segundo nivel umbral.

Como se comenta aquí, en determinadas realizaciones, la cantidad de homodímeros de Her-2 se mide utilizando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar una cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra.

En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos de la presente invención, la expresión alta de Her-2 es un $\log_{10}H2T >$ aproximadamente 1,14-1,125.

En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos que se divulgan aquí, la expresión alta de Her-2 comprende una expresión que es muy alta y/o moderadamente alta. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos que se divulgan aquí, la expresión muy alta de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq$ aproximadamente 1,84 -2,21. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, la expresión moderadamente alta se sitúa entre 1,14 – 1,25 y 1,84-2,21. O se pueden utilizar otros rangos (es decir, hasta aproximadamente un 25 % más o menos como se describe aquí), dependiendo de la cohorte del paciente y/o el evento significativo que se está monitorizando.

En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O puede ser monitorizado cualquier cáncer que pueda ser sensible a un agente anti-Her-2. El agente

anti-Her-2 puede ser cualquier agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es uno de los agentes que se describen aquí. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos de la invención, el subgrupo de Her-2 moderadamente alto se vuelve a subdividir entre subgrupos que expresan por lo menos otro marcador. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se genera una medida predeterminada dividiendo las muestras de Her-2 medio y/o Her-2 alto en por lo menos dos subgrupos, en base al nivel de por lo menos otro biomarcador.

El por lo menos otro biomarcador puede, en realizaciones alternativas, comprender por lo menos uno de FOXM1, PRAME, Bc 12, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GATA3, TFRC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chkl, ID1, EstR1, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG1, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENTI, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1 α , IGFBP3; CTSB, Her3, DIABLO, VEGF, CD31, KDR, o p95.

Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el subgrupo moderadamente alto se divide nuevamente en base a su expresión de Her-3, donde un nivel alto comprende tener Her-3 igual o superior a un primer nivel umbral, y un nivel bajo comprende tener un Her-3 inferior al primer nivel umbral, y donde un sujeto con niveles moderadamente altos de por lo menos un agente de Her-2 y/o dímeros de Her-2, y niveles bajos de Her-3 es probable que responda al agente anti-Her-2, y/o donde un sujeto con niveles moderadamente altos de por lo menos uno Her-2 y/o dímeros de Her-2 y niveles altos de Her-3 es improbable o menos probable que responda al agente anti-Her-2. Donde se mide Her-3, la expresión de Her-3 comprende Her-3, homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-3 (ej. Her-2/Her-3).

En determinadas realizaciones, el ensayo se lleva a cabo con un ensayo VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión, y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.

En determinadas realizaciones, el método comprende la detección en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta (ej. media), el grupo de pacientes puede subdividirse nuevamente en expresores altos de Her-3 y expresores bajos de Her-3. En esta realización, el paciente con Her-2 y/u homodímeros de Her-2 moderadamente altos, y Her-3 bajo es probable que responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presente un largo curso temporal. En realizaciones alternativas, la expresión de Her-3 puede ser expresión de Her-3, homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-2/Her-3.

En determinadas realizaciones de medición tanto de Her-2 como Her-3, el cánceres cáncer de mama. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En otras realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O pueden monitorizarse otros cánceres sensibles a Her-2. El agente anti-Her-2 puede ser cualquier agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es uno de los agentes que se describen aquí. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el ensayo se realiza con un ensayo VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.

En determinadas realizaciones, se crea una medida predeterminada dividiendo las muestras de los pacientes en por lo menos dos subgrupos de pacientes. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es de tres, de forma que la muestra de pacientes se divide en un subgrupo de pacientes cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es muy alto, un subgrupocuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es bajo, y un subgrupo cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alto (es decir, medio). Cada uno de los subgrupos puede ser subdividido a su vez en un subgrupo cuyo Her-3 sea alto o medio.

El nivel de homodímeros de Her-2 puede estar estrechamente correlacionado con los niveles totales de Her-2. Así, en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos de la presente invención, las cantidades de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el sujeto se comparan con por lo menos uno del subgrupo muy alto, el subgrupo moderadamente alto o el subgrupo bajo. Si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, y los expresores de Her-3 son bajos, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un largo curso temporal. Si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, y los expresores de Her-3 son altos, es improbable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es superior a dos, incluyendo, pero sin limitación, tres subgrupos, cuatro subgrupos, cinco subgrupos y seis subgrupos. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST. En determinadas realizaciones preferidas, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

En determinadas realizaciones, la medida predeterminada es un punto de corte óptimo. Tales puntos de corte se divulgan aquí, y determinadas realizaciones de la invención se entienden incluyendo cantidades que se aproximan a las cantidades mencionadas y divulgadas aquí. En determinadas realizaciones, la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el sujeto se comparan con el punto de corte óptimo, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta (ej. entre aproximadamente 1,14-1,25 y 1,84-2,21 H2T), es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y es probable que el curso temporal del paciente

5 sea largo. En otra realización, si la cantidad de Her-2 es alta, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es probable que el curso temporal sea largo. En otra realización, si la cantidad de Her-2 es alta, y la cantidad de homodímeros de Her-2 y/o el cociente de homodímeros de Her-2/ Her-2 son bajos, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es probable que el curso temporal sea largo. En otra realización, si la cantidad de Her-2 es alta y la cantidad de dímeros de Her-2 es alta, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2 y/o el curso temporal sea largo.

10 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto con cáncer Her-2 positivo es probable que responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o el curso temporal de la enfermedad sea largo. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para predecir el curso temporal de la enfermedad en un sujeto con un cáncer Her-2 positivo. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para predecir la probabilidad de un evento significativo en un sujeto con un cáncer Her-2 positivo

15 Por ejemplo, la divulgación comprende métodos para predecir si es probable que un sujeto con un cáncer, y tratado con un agente anti-Her-2, tenga un evento significativo, comprendiendo los pasos de: (a) detectar en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2; y(b) correlacionar la cantidad de Her-2 u homodímeros de Her-2 con la probabilidad de que el sujeto presente un evento significativo.

20 En una realización, el evento significativo es una reducción del tiempo transcurrido entre el diagnóstico de cáncer y por lo menos uno de diagnóstico primario, progresión del cáncer de un estadio a otro más avanzado, progresión a enfermedad metastásica, recidiva, cirugía o defunción. También en determinadas realizaciones, el método puede comprender además la predicción de un curso temporal en el que puede producirse el evento significativo.

25 En una realización, si la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 es igual a o inferior a un primer nivel umbral, el evento significativo es que sea menos probable que el sujeto responda al agente anti-Her-2. Adicional y/o alternativamente, si la cantidad de por lo menos un agente de Her-2 u homodímeros de Her-2 es igual o superior a un segundo nivel umbral superior al primer nivel umbral, el pronóstico del sujeto es que es improbable que responda al agente anti-Her-2.

30 En una realización preferida, el curso temporal se mide determinando el tiempo transcurrido entre eventos significativos en el curso de la enfermedad de un paciente, donde la medición es predictiva de si un paciente tendrá un curso temporal largo. En una realización, el evento significativo es la progresión desde el diagnóstico primario a la defunción. En otra realización, el evento significativo es la progresión desde el diagnóstico primario a la enfermedad metastásica. Y aún en otra realización, el evento significativo es la progresión desde el diagnóstico primario a la recidiva. En otra realización, el evento significativo es la progresión desde la enfermedad metastásica a la defunción. En otra realización el evento significativo es la progresión desde enfermedad la metastásica a la recidiva. En otra realización el evento significativo es la progresión desde la recidiva a la defunción. En determinadas realizaciones, el curso temporal se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando RECIST u otros criterios de respuesta.

35 En determinadas realizaciones, el método comprende la medición en una muestra biológica procedente del cáncer del paciente de la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es alta y/o moderadamente alta, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o presente un curso temporal largo. En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O se pueden monitorizar otros cánceres sensibles a los agentes anti-Her-2. Como se señala aquí, el agente anti-Her-2 puede ser uno de los agentes conocidos. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. O pueden utilizarse otros agentes anti-Her-2.

40 En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de Her-2. En determinadas realizaciones se mide la cantidad de homodímeros de Her-2. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de homodímeros de Her-2 mediante un ensayo capaz de medir y/o cuantificar la cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra. En determinada realización el ensayo es VERATAG®. En determinadas realizaciones se mide la probabilidad de respuesta respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST.

45 En determinadas realizaciones, el método comprende la medición en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-3 y/u homodímeros de Her-3, así como la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-3 y/u homodímeros de Her-3 es alta, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o presente un curso temporal largo. En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. O el cáncer de mama puede ser cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O pueden monitorizarse otros cánceres sensibles a agentes anti-Her-2. Como se indica aquí, el agente anti-Her-2 puede ser uno de los agentes conocidos y/o descritos aquí. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, se mide la cantidad de homodímeros de Her-3. En determinadas realizaciones se mide la cantidad de homodímeros de Her-3 utilizando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar la cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra. En

determinada realización, el ensayo es el VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST.

En determinadas realizaciones, el método comprende medir en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta (es decir media), la muestra biológica es posteriormente analizada respecto a la cantidad de expresores de Her-3, donde los expresores de Her-3 pueden ser expresión de Her-3, homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-2/Her-3. Si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, y la cantidad de expresores de Her-3 es alta, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y presente un curso temporal largo. A la inversa, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, y la cantidad de expresores de Her-3 es baja, es improbable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente tendrá un curso temporal corto. En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. O el cáncer de mama puede ser cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O se puede monitorizar cualquier otro cáncer que responda a agentes anti-Her-2. Como se indica aquí, el agente anti-Her-2 puede ser uno de los agentes conocidos y/o descritos aquí. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinada realización el ensayo es el VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST.

En determinadas realizaciones, se crea una medida predeterminada dividiendo las muestras de los pacientes en por lo menos dos subgrupos de pacientes. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es tres, de forma que la muestra de pacientes se divide en un subgrupo de pacientes cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es alto, y un subgrupo cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es bajo. En determinadas realizaciones, el subgrupo de Her-2 alto se divide en un subgrupo cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es muy alto, y un subgrupo cuyo Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alto (es decir, medio). En una realización, la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el sujeto se compara con el grupo muy alto, el subgrupo moderadamente alto, o el subgrupo bajo. Si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal largo. Si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es muy alta o baja, es improbable que el paciente responda a un agente anti Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal corto.

En otra realización, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, y la cantidad de expresores de Her-3 es alta, es improbable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presenta un curso temporal corto. En otra realización, si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es moderadamente alta, y la cantidad de expresores Her-3 es baja, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente presente un curso temporal largo. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es superior a tres, incluyendo, pero sin limitación, cuatro subgrupos, cinco subgrupos y seis subgrupos. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta o el curso temporal se miden respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST. En determinadas realizaciones preferidas, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

En determinadas realizaciones, la medida predeterminada es un punto de corte óptimo. Esos puntos de corte óptimos se divulgan aquí, y determinadas realizaciones de la invención incluyen cantidades próximas a las cantidades mencionadas y divulgadas aquí. En determinadas realizaciones, la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el sujeto se comparan con el punto de corte óptimo; si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 en el paciente es alta o moderadamente alta, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o el curso temporal del paciente es probable que sea largo. En otra realización, si la cantidad de Her-2 es alta, y la cantidad de homodímeros de Her-2 y/o el cociente de homodímeros de Her-2/Her-2 son bajos, es probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o el curso temporal probablemente sea largo. En otra realización, si la cantidad de Her-2 es alta y la cantidad de homodímeros de Her-2 y/o el cociente homodímeros de Her-2/Her-2 es alto, es probable que el paciente responda al agente anti-Her-2, y/ el curso temporal sea largo.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para determinar si es improbable que un sujeto con cáncer Her-2 positivo responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto la cantidad de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 es baja, es improbable que el sujeto responda al tratamiento con el agente anti-Her-2, y/o es probable que paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones preferidas, el agente anti-Her-2 es trastuzumab.

Cualquier método conocido por un experto en la técnica como útil para determinar una cantidad de expresión de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, y/o expresión de Her-3 y/u homodímeros de Her-3, y/o heterodímeros de Her-2/Her-3, puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, cualquier ensayo cuantitativo que determine la cantidad de tal expresión o dímeros puede utilizarse para determinar el nivel de señal generado por una célula o cáncer, luego la señal se compara con la señal generada en el ensayo VERATAG® para determinar una correspondencia entre los dos ensayos. Tales métodos pueden incluir, pero no necesariamente con limitación a ellos, FRET, BRET, Complementación Biomolecular de Fluorescencia, y Ensayo de Ligación de Proximidad.

- 5 En determinadas realizaciones, las cantidades se determinan por contacto de una muestra biológica de un sujeto con cáncer con un compuesto ligante con una etiqueta molecular sujeta mediante un enlace escindible y una sonda de escisión con una fracción inductora de escisión, y detectando si y qué etiqueta molecular es liberada. La Figura 1 proporciona un esquema de ese ensayo FFPEVERATAG® , donde se fijan secciones de tejido (panel superior o primero), y luego se deja que se ligan a un primer anticuerpo con un agente inductor de escisión (representado como un instrumento cortante), y un segundo anticuerpo ligado a una fracción detectable (ETAG®) (segundo panel), fotoinducción del agente inductor de escisión por luz (hv) (segundo panel), separación electroforética de las de e-etiqueta(s) (cuarto panel) y una lectura de los datos (panel inferior o quinto).
- 10 En determinadas realizaciones, el compuesto ligante y la sonda de escisión se ligan cada uno específicamente a Her-2 o Her-3. En determinadas realizaciones, la sonda de escisión y la sonda ligante no se ligan al mismo epítipo. En determinadas realizaciones, si el compuesto ligante se encuentra en una proximidad efectiva de la fracción inductora de escisión de la sonda de escisión, la fracción inductora de escisión escinde el enlace escindible, de forma que la etiqueta molecular es liberada. En determinadas realizaciones, la etiqueta molecular liberada si están presentes homodímeros de Her-2, homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-2/Her-3, se distingue de la etiqueta molecular liberada si están presentes monómeros de Her-2 y/o monómeros de Her-3. Se presentan ejemplos de detección de Her-2 mediante un ensayo para la detección de Her-2 total y/u homodímeros de Her-2, en la Publicación de Solicitud de Patente EE.UU N° 2009/0191559 de propiedad común. Se puede aplicar una estrategia similar para medir otros biomarcadores, tales como Her-3, p-95 y similares.
- 15 En determinadas realizaciones, activando la fracción inductora de escisión se escinde el enlace escindible. En determinadas realizaciones, el compuesto ligante liga específicamente un epítipo Her-2 o Her-3. En determinadas realizaciones, el compuesto ligante comprende un anticuerpo o fragmento ligante de antígeno. En determinadas realizaciones, el compuesto ligante se liga específicamente a un punto de unión ligante de Her-2, o un punto de unión ligante de Her-3. En determinadas realizaciones, el compuesto ligante comprende un ligante de Her-2 y/o un ligante de Her-3. En determinadas realizaciones, el compuesto ligante y la sonda de escisión se ligan al mismo epítipo de Her-2 y/o un epítipo de Her-3.
- 20 En determinadas realizaciones, y como se ilustra en la Figura 2 A que muestra la medición de Her-2 total utilizando dos anticuerpos distintos, uno con un agente de escisión, y uno con una etiqueta, y la Figura 2B que muestra la medición de dímeros de Her-2 utilizando un único anticuerpo alternativamente sujeta a un agente de escisión o a una fracción ligante, el paso de medir las cantidades de uno o más homodímeros de Her-2, homodímeros de Her-3, o heterodímeros de Her-2/Her-3, comprende las siguientes fases: (i) proporcionar para cada uno de los homodímeros de Her-2 (uno o más) una sonda de escisión (ej. anticuerpo 15 en la Figura 2 A, y anticuerpo 8 en la Figura 2B) específica para una primera proteína Her-2 en cada uno de los homodímeros de Her-2, teniendo cada sonda de escisión una fracción inductora de escisión con una proximidad efectiva; (ii) proporcionar uno o más compuestos ligantes (ej., anticuerpo 8 en las Figuras 2 A y 2B) específicos para una segunda proteína de cada uno de los uno o más homodímeros de Her-2, de forma que cada compuesto ligante tiene una o más etiquetas moleculares cada una sujeta a ellos mediante un enlace escindible, y de forma que una o más etiquetas sujetas a distintos compuestos ligantes tienen distintas características de separación, por lo que en la separación las etiquetas moleculares de distintos compuestos ligantes forman diferentes picos en un perfil de separación; (iii) mezclar las sondas de escisión, los compuestos ligantes y el uno o más complejos, de forma que las sondas de escisión se ligan específicamente a las primeras proteínas de los homodímeros de Her-2, y los compuestos ligantes se ligan específicamente a las segundas proteínas de los homodímeros de Her-2, y de forma que los enlaces escindibles de los compuestos ligantes se hallan en proximidad efectiva de las fracciones inductoras de escisión de las sondas de escisión, de modo que se liberan las etiquetas moleculares; and (iv) separando e identificando las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia de la cantidad de homodímeros de Her-2.
- 25 En determinadas realizaciones, el paso de la medición de las cantidades de uno o más homodímeros de Her-2 , homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-2/Her-3 comprende las siguientes fases: (i) proporcionar para cada uno de los homodímeros de Her-2 una sonda de escisión específica para una primera proteína Her-2 en cada uno de los homodímeros de Her-2, teniendo cada sonda de escisión una fracción inductora de escisión con una proximidad efectiva; (ii) proporcionando uno o más compuestos ligantes específicos para una segunda proteína de cada uno de los uno o más homodímeros de Her-3, de forma que cada compuesto ligante tiene una o más etiquetas moleculares sujetas mediante un enlace escindible, y que la o las etiquetas moleculares sujetas a distintos compuestos ligantes tienen distintas características de separación, de forma que a la separación etiquetas moleculares de distintos compuestos ligantes forman distintos picos en un perfil de separación; (iii) mezclar las sondas de escisión, los compuestos ligantes y el o los complejos, de forma que las sondas de escisión se ligan específicamente a las primeras proteínas de los homodímeros de Her-3, y los compuestos ligantes se ligan específicamente a las segundas proteínas de los homodímeros de Her-3, y de modo que los enlaces escindibles de los compuestos ligantes se hallan en proximidad efectiva de fracciones inductoras de escisión de las sondas de escisión, de modo que se liberan etiquetas moleculares; y (iv) separar e identificar las etiquetas moleculares liberadas para determinar la presencia o ausencia de la cantidad de homodímeros de Her-3.
- 30 Los heterodímeros de Her-2/Her-3 puede ser determinados de forma similar utilizando sondas de escisión y sondas ligantes específicas para Her-2 y Her-3, ej. una sonda de escisión específica para Her-2 y una sonda ligante específica para Her-3, y/o una sonda de escisión específica para Her-3 y una sonda ligante específica para Her.2

La divulgación se refiere a agentes anti-Her-2. Un agente anti-Her-2 puede ser cualquier agente conocido por un experto en la técnica. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 se selecciona del grupo consistente en 4D5, trastuzumab, AEE-788 y lapatinib. En una realización preferida, el agente anti-Her-2 es trastuzumab (Herceptin®). Ver.ej., Goldenberg, 1999, ClinTher.21 :309-18; y Shak, 1999, SeminOncol. 26:71-7. También pueden evaluarse otros agentes anti-Her-2 utilizando los métodos que se describen aquí.

Las muestras conteniendo Her-2 y/o homodímeros de Her-2, y/o Her-3 y homodímeros de Her-3, y/o heterodímeros de Her-2/Her-3 adecuados para su uso como biomarcadores, pueden proceder de una amplia variedad de fuentes, incluyendo cultivos celulares, tejidos animales o vegetales, biopsias de pacientes o similares. De preferencia, las muestras proceden de pacientes humanos. Las muestras se preparan para ensayos de la invención utilizando técnicas convencionales, que pueden depender de la fuente de donde se tome la muestra. Para biopsias y especímenes médicos, se proporciona orientación en las siguientes referencias: Bancroft JD & Stevens A, eds. 1977, Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, Edimburgo; Pearse, 1980, Histochemistry. Theory and applied. 4th ed., Churchill Livingstone, Edimburgo.

En el área de la enfermedad cancerosa, los ejemplos de muestras de tejido de pacientes que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, mama, próstata, ovario, colon, pulmón, endometrio, estómago, glándula salivar o páncreas. La muestra de tejido puede ser obtenida mediante diversos procedimientos, incluyendo escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, los ensayos de la invención se llevan a cabo sobre muestras de tejido que han sido fijadas e incluidas en parafina, y se procede a un paso de la desparafinización. Una muestra de tejido puede fijarse (es decir, conservarse) mediante metodología convencional. Ver, por ej., Lee G. Luna, HT (ASCP) Ed., 1960, Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology 3rd edition, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; Ulreka V. Mikel, Ed., 1994, The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C. Un experto en la técnica apreciará que la elección de un fijador viene determinada por el fin para el cual el tejido es teñido histológicamente analizado de otro modo. Un experto en la técnica apreciará también que la extensión de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijador utilizado.

En general, una muestra de tejido se fija primero y luego se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se incluye en parafina u otro medio de seccionamiento, de modo que la muestra de tejido pueda ser seccionada. Alternativamente, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. Por vía de ejemplo, la muestra de tejido puede ser incluida y procesada en parafina mediante metodología convencional, de acuerdo con técnicas convencionales descritas en las referencias antes mencionadas. Los ejemplos de la parafina que puede ser utilizada incluyen, pero sin limitación, Paraplast, Broloid y Tissuemay. Una vez incluida la muestra de tejido, se puede seccionar con un micrótopo siguiendo técnicas convencionales. Las secciones pueden tener un grosor situado en un rango que va de aproximadamente tres micrones a aproximadamente doce micrones, y de preferencia un grosor comprendido en un rango de aproximadamente 5 a 10 micrones. En un aspecto, una sección puede tener un área de aproximadamente 10 mm² a aproximadamente 1 cm². Una vez cortadas, las secciones pueden ser sujetas a portaobjetos mediante varios métodos estándar. Los ejemplos de adhesivos de portaobjetos incluyen, pero sin limitación, silano, gelatina y poli-L-lisina. Las secciones incluidas en parafina pueden ser sujetas a portaobjetos cargados positivamente y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

Si se ha utilizado la parafina como material de inclusión, las secciones de tejidos son generalmente desparafinadas y rehidratadas con agua antes de proceder a la detección de biomarcadores. Las secciones de tejido pueden ser desparafinadas mediante varias metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, se pueden utilizar xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes, de acuerdo con técnicas convencionales descritas en las referencias indicadas más arriba. Alternativamente, se pueden utilizar agentes no orgánicos desparafinizadores disponibles en el comercio, tales como Hemo-De(R) (CMS, Houston, Tex.).

Las células de cultivos celulares de mamíferos, o tejidos frescos o congelados pueden prepararse mediante técnicas de lisis celular convencionales (ej, 0,14 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-Cl (pH 8,6), 0,5% Nonidet P-40, e inhibidores de proteasas y/o fosfatasa, según se requiera). En los tejidos de mamíferos frescos, la preparación de las muestras puede incluir también un paso de desagregación del tejido, tal como aplastamiento, picado, molido o sonicación.

Se obtienen muchas ventajas midiendo las poblaciones de dímeros utilizando etiquetas moleculares liberables, incluyendo (1) la separación de etiquetas moleculares liberadas de una mezcla de ensayo proporciona un fondo muy reducido y un significativo aumento de la sensibilidad; y (2) el uso de etiquetas moleculares especialmente diseñadas para facilitar la separación y la detección proporciona una conveniente capacidad multiplexora, de modo que los componentes de complejos de receptores múltiples pueden ser medidos simultáneamente con facilidad en el mismo ensayo. Los ensayos en que se emplean tales etiquetas pueden tener diversas formas y se divulgan en las siguientes referencias: Patente EE.UU números 7 105 308 y 6 627 400; Solicitud de Patente EE.UU publicada números 2002/0013126, 2003/0170915, 2002/0146726, y 2009/0191559; y Publicación de Patente Internacional N° WO 2004/011900. Por ejemplo, se puede emplear una amplia variedad de técnicas de separación que pueden distinguir las moléculas en base a una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que están siendo separadas, incluyendo movilidad electroforética, peso molecular, forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, cociente carga/masa o polaridad. En un aspecto, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto

difieren en características de movilidad electroforética y detección óptica, y se separan por electroforesis. En otro aspecto, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto pueden diferir en peso molecular, forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, polaridad y se separan por HPLC de fase normal o de fase inversa, HPLC de intercambio iónico, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas o cromatografía de fase gaseosa.

5 Se proporcionan conjuntos de etiquetas moleculares que se pueden separar en distintas bandas o picos mediante una técnica de separación, después de ser liberadas de los compuestos ligantes. La identificación y cuantificación de tales picos proporciona una medida o perfil de la presencia y/o cantidades de dímeros de receptores. Dentro de un conjunto, las etiquetas moleculares pueden ser químicamente distintas; no obstante, a efectos de conveniencia, los conjuntos de etiquetas moleculares están en general relacionados químicamente. Por ejemplo, puede ser todos
10 péptidos o pueden consistir en distintas combinaciones de los mismos bloques básicos o monómeros, o pueden ser sintetizadas utilizando la misma estructura básica con distintos grupos sustituyentes, para impartir distintas características de separación. El número de etiquetas moleculares en una pluralidad puede variar dependiendo de diversos factores, incluyendo el modo de separación empleado, los marcadores utilizados en las etiquetas moleculares para su detección, la sensibilidad de las fracciones ligantes y la eficiencia en la escisión de los enlaces escindibles.

15 Las mediciones efectuadas directamente en muestras de tejidos pueden ser normalizadas incluyendo mediciones en dianas celulares o tisulares que sean representativas del número total de células en la muestra, y/o los números de subtipos específicos de células en la muestra. Las mediciones adicionales pueden ser preferidas, o incluso necesarias, dada la heterogenicidad celular y tisular en las muestras de pacientes, en especial en las muestras tumorales, que pueden comprender fracciones substanciales de células normales.

20 Como se ha mencionado más arriba, se pueden proporcionar mezclas que contengan pluralidades de compuestos ligantes distintos, donde cada compuesto ligante tiene una o más etiquetas moleculares unidas mediante enlaces escindibles. La naturaleza del compuesto ligante, el enlace escindible y la etiqueta molecular pueden variar ampliamente. Un compuesto ligante puede comprender una composición ligante de anticuerpos, un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular capaz deligarse específicamente a una proteína o molécula diana, o formación de complejo estable con un analito de interés, como un homodímero de Her-2. En un aspecto, un compuesto ligante puede ser representado mediante la siguiente fórmula:

30 $B-(L-E)_k$

donde B es una fracción ligante; L es un enlace escindible y E es una etiqueta molecular. En ensayos homogéneos, L, el enlace escindible puede ser un enlace lábil a la oxidación, y más preferiblemente, es un enlace que puede ser escindido por oxígeno singlete. La fracción " $-(L-E)_k$ " indica que un compuesto ligante individual puede tener múltiples
35 etiquetas moleculares unidas vía enlaces escindibles. En un aspecto, k es un entero mayor o igual a uno, pero en otras realizaciones, k puede ser mayor de varios centenares, ej. de 100 a 500, o k es superior a varios centenares, hasta varios miles, ej. de 500 a 5000. Habitualmente, cada pluralidad de distintos tipos de compuestos ligantes tiene una etiqueta molecular distinta, E. Los enlaces escindibles, ej. enlaces lábiles a la oxidación, y las etiquetas moleculares, E, están unidos a B mediante químicas convencionales.

40 Preferentemente, B es una composición ligante de anticuerpos, que se une específicamente a una diana, como un determinante antigénico en Her-2. En los ejemplos expuestos aquí se indican anticuerpos específicos para epítomos de Her-2. Las composiciones de anticuerpos se forman fácilmente a partir de una amplia variedad de anticuerpos disponibles en el comercio, monoclonales o policlonales. En especial, anticuerpos específicos de receptores de factor de crecimiento epidérmico se divulgan en la Patente EE.UU N ° 5 677 171; 5 772 997; 5 968 511; 5 480 968; 5 811 098. La Patente EE.UU 5 599 681, divulga anticuerpos específicos para puntos de fosforilación de proteínas.
45 Proveedores comerciales, como Cell Signaling Technology (Beverly, MA), Biosource International (Camarillo, CA) y Upstate (Charlottesville, VA) proporcionan también anticuerpos monoclonales y policlonales.

El enlace escindible, L, puede ser virtualmente cualquier grupo químico ligante que puede ser escindido en condiciones que no degraden la estructura, o afecten a las características de detección de la etiqueta molecular liberada, E. Siempre que se utiliza una sonda de escisión en un formato de ensayo homogéneo, el enlace escindible,
50 L, es escindido por un agente de escisión generado por la sonda de escisión que actúa en una distancia corta, de forma que solamente se escinden enlaces escindibles en la proximidad inmediata de la sonda de escisión. Típicamente, tal agente debe ser activado introduciendo un cambio físico o químico en la mezcla de reacción, de forma que el agente produce una especie activa de vida corta que se difunde a un enlace escindible para efectuar una escisión. En un formato homogéneo, el agente de escisión está de preferencia unido a una fracción ligante, tal como un anticuerpo, que dirige antes de la activación al agente de escisión hacia un punto particular situado en la proximidad de un compuesto ligante con etiquetas moleculares liberables. En tales realizaciones, un agente de escisión es denominado aquí una "fracción inductora de escisión".

En un formato no homogéneo, como los compuestos ligantes ligados específicamente están separados de los compuestos ligantes no ligados, está disponible para su uso una mayor selección de enlaces escindibles y agentes de escisión. Los enlaces escindibles pueden no incluir solamente enlaces que sean lábiles a la reacción con una especie reactiva que actúe localmente, como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete o similares, sino también
60

enlaces que son lábiles frente a agentes que operan a través de una mezcla de reacción, como enlaces lábiles frente a bases, enlaces fotoescindibles, enlaces escindibles por reducción, enlaces escindibles por oxidación, enlaces lábiles frente a ácidos y enlaces peptídicos escindibles por proteasas específicas. Las referencias que describen muchos de tales enlaces incluyen Greene and Wuts, 1991, Protective Groups in Organic Synthesis, Second Edition, John Wiley & Sons, New York; Hermanson, 1996, Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York; y la Patente EE.UU N ° 5 565 324.

En un aspecto, en la invención pueden emplearse sistemas de reactivos escindibles disponibles en el comercio. Por ejemplo, puede introducirse un enlace bisulfuro entre una composición ligante de anticuerpo y una etiqueta molecular, utilizando un agente heterofuncional como el N- succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2- piridilditio)tolueno (SMPT) o similares, disponible de proveedores tales como Pierce Chemical Company (Rockford, IL). Las uniones bisulfuro introducidas por tales enlaces pueden romperse mediante tratamiento con un agente reductor, tal como ditiotreitól (DTT), ditioeritritól (DTE), 2-mercaptoetanol o borodidruo de sodio. Las concentraciones típicas de los agentes reductores para efectuar la escisión de las uniones bisulfuro se sitúan en el rango de 10 a 100 mM. Se puede introducir un enlace oxidativamente lábil entre una composición ligante de anticuerpo y una etiqueta molecular utilizando el reactivo de reticulación éster NHS homobifuncional, disuccinimidilatrato (DST) (disponible de Pierce) que contiene dioles cis centrales susceptibles de escisión con periodato sódico (ej., 15 mM periodato a pH fisiológico durante 4 horas). Los enlaces que contienen componentes separadores esterificados pueden ser escindidos con agentes nucleofílicos fuertes, tales como hidroxilamina, ej., 0,1 N hidroxilamina, pH 8,5, durante 3-6 horas a 37°C. Tales separadores pueden ser introducidos mediante un agente de reticulación homobifuncional, como el etilenglicol bis (succinimidilsuccinato) (EGS) obtenible de Pierce (Rockford, IL). Se puede introducir un enlace lábil frente a bases mediante un grupo sulfona. Los agentes de reticulación homobifuncionales que pueden utilizarse para introducir grupos sulfona en un enlace escindible incluyen bis[2- (succinimidiloxycarbonilo)etil]sulfona (BSOCOES), y 4,4-difluoro-3,3- dinitrofenilsulfona (DFDNPS). Los ejemplos de condiciones básicas para la escisión incluyen 0,1 M fosfato sódico, ajustado a pH 11,6 por adición de base Tris, conteniendo 6 M urea, 0,1 % SDS, y 2 mM DTT, con incubación a 37°C durante 2 horas. Los enlaces fotoescindibles incluyen también los divulgados en la Patente EE.UU N ° 5 986 076.

Cuando L es lábil a la oxidación, L puede ser un tioéter o su análogo de selenio; o una olefina, que contiene dobles uniones carbono-carbono, donde la escisión de una unión doble a un grupo oxo libera la etiqueta molecular, E. Se divulgan enlaces lábiles a la oxidación ilustrativos en la Patente EE.UU N ° 6 627 400 y 5 622 929 y en la Solicitud de Patente EE.UU publicada N ° 2002/0013126 y 2003/0170915.

En la presente invención, la etiqueta molecular, E, puede comprender una etiqueta electroforética, como se describe en las siguientes referencias, cuando la separación de pluralidades de etiquetas moleculares es realizada por cromatografía de gas o espectrometría de masas: Ver, ej., Zhang et al, 2002, Bioconjugate Chem. 13:1002-1012; Giese, 1983, Anal. Chem. 2:165-168; y Patente EE.UU N ° 4 650 750; 5 360 819; 5 516 931; y 5 602 273.

La etiqueta molecular, E, es de preferencia un compuesto orgánico hidrosoluble, estable respecto a la especie activa, en especial oxígeno singlete, y que incluye un grupo de detección o reporter. Por otra parte, E puede variar ampliamente en tamaño y estructura. En un aspecto, E tiene un peso molecular del orden de aproximadamente 50 a 2500 daltons, de preferencia de aproximadamente 50 a 1500 daltons. E puede comprender un grupo de detección para generar una señal electroquímica, fluorescente o cromogénica. En realizaciones en las que se utiliza la detección por masa, E puede no tener una fracción separada a efectos de detección. De preferencia, el grupo de detección genera una señal fluorescente.

Las etiquetas moleculares dentro de una pluralidad se seleccionan de forma que cada una tenga una característica de separación única y/o una propiedad óptica única respecto a los otros miembros de la misma pluralidad. En un aspecto, la característica de separación cromatográfica o electroforética es el tiempo de retención en un conjunto de condiciones de separación estándar convencionales en la técnica, ej., voltaje, presión de columna, tipo de columna, fase móvil o medio de separación electroforética. En otro aspecto, la propiedad óptica es una propiedad de fluorescencia, como el espectro de emisión, duración de la fluorescencia o intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda o banda de longitudes de onda determinadas. De preferencia, la propiedad de la fluorescencia es su intensidad. Por ejemplo, cada etiqueta molecular de una pluralidad puede tener las mismas propiedades de emisión fluorescente, pero todas diferirán entre sí en virtud de un tiempo de retención distinto. Por otra parte, una, dos o más de las etiquetas moleculares de una pluralidad pueden tener idénticos tiempos de migración o retención, pero tendrán propiedades fluorescentes distintas, ej., espectros de emisión resolubles espectralmente, de modo que todos los miembros de la pluralidad pueden distinguirse por la combinación de separación molecular y medición de fluorescencia.

De preferencia, las etiquetas moleculares son detectadas por separación electroforética y la fluorescencia de un grupo de detección. En tales realizaciones, etiquetas moleculares con propiedades de fluorescencia substancialmente idénticas tienen movilidades electroforéticas distintas, de modo que en un electroferograma se forman picos distintos bajo condiciones de separación. De preferencia, las pluralidades de etiquetas moleculares de la invención se separan mediante aparatos de electroforesis capilar convencionales, tanto en presencia como en ausencia de una matriz de tamizado convencional. Durante o después de la separación electroforética, las etiquetas moleculares son detectadas o identificadas registrando las señales de fluorescencia y los tiempos de migración (o

distancias de migración) de los distintos compuestos, o construyendo un gráfico de fluorescente relativo y orden de migración de las etiquetas moleculares (ej., como un electroferograma). De preferencia, la presencia, ausencia y/o cantidades de etiquetas moleculares se miden utilizando uno o más estándares, como se divulga en la Solicitud de Patente EE.UU N° 2003/0170734A1. La Figura 3 muestra un ejemplo de separación electroforética de una etiqueta de Her-2, de acuerdo con una realización de la presente invención.

También se pueden diseñar pluralidades de etiquetas moleculares por separación, mediante cromatografía basada en una o más características físicas, que incluyen peso molecular, forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, polaridad o similares, ej., como se divulga en la Solicitud de Patente EE.UU N° 2003/0235832. Una técnica de separación cromatográfica se selecciona en base a parámetros tales como tipo de columna, fase sólida, fase móvil y similares, seguido por la selección de una pluralidad de etiquetas moleculares que pueden ser separadas para formar picos o bandas distintos en una única operación. Varios factores determinan qué técnica HPLC se selecciona para su uso en la invención, incluyendo el número de etiquetas moleculares a detectar (es decir, el tamaño de la pluralidad), las cantidades estimadas de cada etiqueta molecular que se generarán en los ensayos, la disponibilidad y facilidad de sintetizar etiquetas moleculares que son candidatas para que un conjunto se utilice en ensayos multiplexados, la modalidad de detección empleada, y la disponibilidad, solidez, coste y facilidad operativa de la instrumentación HPLC, las columnas y los disolventes. En general, se prefieren las columnas y técnicas adecuadas para analizar cantidades limitadas de muestra y que proporcionan las separaciones de máxima resolución. Se puede obtener orientación sobre cómo hacer dichas selecciones en la literatura, como, por ejemplo, Snyder et al, 1988, Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons, New York; Millner, 1999, High Resolution Chromatography: A Practical Approach, Oxford University Press, New York; Chi-San Wu, 1999, Column Handbook for Size Exclusion Chromatography, Academic Press, San Diego; y Oliver, 1989, HPLC of Macromolecules: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.

En un aspecto, la etiqueta molecular E es (M, D), donde M es una fracción modificadora de movilidad, y D una fracción de detección. La anotación "(M, D)" se utiliza para indicar que el orden de las fracciones M y D pueden ser tal que cada fracción puede ser adyacente al enlace escindible, L. Es decir, "B-L-(M, D)" designa al compuesto ligante de cualquiera de las dos formas: "B-L-M-D" o "B-L-D-M."

La fracción de detección, D, puede ser una etiqueta o tinción fluorescente, una etiqueta o tinción cromogénica o una etiqueta electroquímica. De preferencia, D es una tinción fluorescente. Los ejemplos de tinciones fluorescentes a usar con la invención incluyen tinciones de rodamina hidrosolubles, fluoresceínas, 4,7- diclorofluoresceínas, tinciones de benzoxantenos, y tinciones de transferencia de energía, como se divulga en las siguientes referencias: Anónimo, 2002, Handbook of Molecular Probes and Research Reagents, 8th ed., Molecular Probes, Eugene, O; Patente EE.UU N° 6 191 278, 6 372 907, 6 096 723, 5 945 526, 4 997 928, y 4 318 846; y Lee et al, 1997, Nucleic Acids Research 25:2816-2822. De preferencia, D es una fluoresceína o un derivado de la fluoresceína.

Cuando todos los compuestos ligantes son derivatizados por separado por una etiqueta molecular distinta, se combinan con otros compuestos ligantes para formar una pluralidad de compuestos ligantes. Habitualmente, cada tipo distinto de compuesto ligante está presente en una composición en la misma proporción; no obstante, las proporciones pueden variarse según el diseño elegido, de modo que uno o un subconjunto de compuestos ligantes determinados estén presentes en una proporción mayor o menor, dependiendo de lo que se desee o de los requerimientos de una realización o ensayo determinados. Entre los factores que pueden afectar a la elección del diseño se incluyen, pero sin limitación, la afinidad y aidez de los anticuerpos por una diana determinada, la prevalencia relativa de una diana, las características fluorescentes de una fracción de detección de una etiqueta molecular y similares.

Una fracción inductora de escisión, o agente de escisión, es un grupo que produce una especie activa que es capaz de escindir un enlace escindible, de preferencia por oxidación. De preferencia, la especie activa es una especie química que presenta una actividad de corta duración, de forma que sus efectos inductores de escisión se dan solamente en la proximidad del punto de su generación. La especie activa es inherentemente de corta vida, de modo que no cree un fondo significativo más allá de la proximidad de su creación, o se emplea un secuestrador que elimine eficientemente la especie activa, de forma que no esté disponible para reaccionar con enlaces escindibles más allá de una distancia corta desde su punto de generación. Se incluyen en los ejemplos de especies activas el oxígeno singlet, el peróxido de hidrógeno, NADH, y los radicales hidroxilos, los radicales fenoxilo, el superóxido y similares. Entre los inactivadores ilustrativos de la especie activa que provocan oxidación se incluyen los polienos, carotenoides, vitamina E, vitamina C, N-conjugados aminoácido pirrol de tirosina, histidina y glutatona. Ver, ej., Beutner et al, 2000, Meth. Enzymol. 319:226-241.

Una consideración al diseñar ensayos empleando una fracción inductora de escisión y un enlace escindible es que no estén tan separados entre sí al unirse a un complejo de receptor, que la especie activa generada por la fracción inductora de escisión no pueda escindir eficientemente el enlace escindible. En un aspecto, los enlaces escindibles se sitúan de preferencia dentro de aproximadamente 1000 nm y preferentemente dentro de unos 20-200 nm, de una fracción inductora de escisión ligada. Más preferentemente, para fracciones inductoras de escisión delfotosensibilizador generando oxígeno singlete, los enlaces escindibles están dentro de aproximadamente 20-100 nm de un fotosensibilizador en un complejo receptor. El rango dentro del cual una fracción inductora de escisión puede escindir efectivamente un enlace escindible (es decir, escinde suficiente etiqueta molecular para generar una señal detectable) se denomina aquí su "proximidad efectiva". Un experto habitual en la técnica reconocerá que la

proximidad efectiva de un sensibilizador determinado puede depender de los detalles del diseño de un ensayo concreto, y puede ser determinado o modificado por experimentación rutinaria.

Un sensibilizador es un compuesto al que se puede inducir a generar un intermediario reactivo, o especie, generalmente oxígeno singlete. De preferencia, un sensibilizador utilizado de acuerdo con la invención es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores incluidos dentro del ámbito de la invención son compuestos que por excitación por calor, luz, radiación ionizante o activación química liberan una molécula de oxígeno singlete. Los miembros más conocidos de esta clase de compuestos incluyen los endoperóxidos, como 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno endoperóxido, 9,10-difenilantraceno-9,10-endoperóxido y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 5,12-endoperóxido. El calor o la absorción directa de la luz por parte de esos compuestos liberan oxígeno singlete. Otros sensibilizadores son divulgados por Di Mascio et al, 1994, FEBS Lett. 355:287; y Kanofsky, 1983, J.Biol.Chem. 258:5991-5993; Pierlot et al, 2000, Meth.Enzymol. 319:3-20.

Los fotosensibilizadores se pueden fijar directa o indirectamente, vía enlaces covalentes o no covalentes, al agente ligante de un reactivo específico de clase. Orientaciones para la formación de tales composiciones, en especial anticuerpos como agentes ligantes, están disponibles en la literatura, ej. en los campos de la terapia fotodinámica, el inmunodiagnóstico y similares. Pueden hallarse ejemplos orientativos en Ullman et al, 1994, Proc. Natl. Acad. ScL USA 91, 5426-5430; Strong et al, 1994, Ann. New York Acad. ScL 745: 297-320; Yarmush et al, 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst. 10: 197-252; y Patente EE.UU N ° 5 709 994, 5 340 716, 6 251 581, y 5 516 636.

Hay disponible una amplia variedad de fuentes de luz para fotoactivar los fotosensibilizadores para generar oxígeno singlete. Se pueden utilizar fuentes policromáticas y monocromáticas mientras la fuente sea suficientemente intensa para producir bastante oxígeno singlete en un tiempo práctico. La duración de la irradiación depende de la naturaleza del fotosensibilizador, la naturaleza del enlace escindible, la potencia de la fuente de irradiación y su distancia hasta la muestra. En general, el periodo de irradiación puede ser inferior a aproximadamente un microsegundo, hasta unos 10 minutos, habitualmente en el rango de aproximadamente un milisegundo hasta unos 60 segundos. La intensidad y duración de la irradiación debe ser suficiente para excitar por lo menos aproximadamente un 0,1 % de las moléculas del fotosensibilizador, habitualmente por lo menos un 30 % de las moléculas del fotosensibilizador, y de preferencia substancialmente todas las moléculas del fotosensibilizador. Los ejemplos de fuentes de luz incluyen láseres, tales como, por ej. láseres helio-neón, láseres de argón, láseres YAG, láseres He/Cd y láseres de rubí; fotodiodos; lámparas de vapor de mercurio, sodio y xenón; lámparas incandescentes, como, por ej. de tungsteno y tungsteno/halógeno y lámparas de flash. Como ejemplo, un dispositivo de fotoactivación adecuado para su uso en los métodos de la invención se divulga en la Publicación de la Patente Internacional N ° WO 03/051669. En tales realizaciones, el dispositivo de fotoactivación es un conjunto de diodos emisores de luz(LEDs) montados en bastidor que permite la iluminación simultánea de todos los pocillos en una placa de 96 pocillos.

Son ejemplos de fotosensibilizadores que pueden ser utilizados en la presente invención los que tienen las propiedades antes mencionadas, y los divulgados por la Patente EE.UU N° 5 536 834, 5 763 602, 5 565 552, 5 709 994, 5 340 716, 5 516 636, 6 251 581, y 6 001 673; la Solicitud de Patente Europea publicada N ° 0484027; Martin et al, 1990, Methods Enzymol. 186:635-645; y Yarmush e^α, 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst. 10:197-252. Al igual que con los sensibilizadores, en determinadas realizaciones, un fotosensibilizador puede ir asociado a un soporte de fase sólida, fijándose de forma covalente o no covalente a la superficie del soporte, o incorporado al cuerpo del soporte. En general, el fotosensibilizador va asociado al soporte en una cantidad suficiente para conseguir la cantidad necesaria de oxígeno singlete. En general, la cantidad de fotosensibilizador se determina empíricamente según métodos rutinarios.

En una realización, un fotosensibilizador se incorpora a una partícula de látex para formar perlas de fotosensibilizador, por ej., como se divulga en la Patente EE.UU N ° 5 709 994 y 6 346 384; y la Publicación de la Patente Internacional N ° WO 01/84157. Alternativamente, se pueden preparar perlas de fotosensibilizador fijando covalentemente un fotosensibilizador, como rosa de bengala, a perlas de látex de 0,5 micrones, mediante grupos clorometil sobre el látex para obtener un grupo éster ligante, como se describe en J. Amer. Chem. Soc, 97:3741 (1975). Esta reacción puede llevarse a cabo, por ejemplo, en una placa de microtitulación de 96 o 384 pocillos, o similares, con un filtro de membrana que forma una pared, por ej., el fondo, de los pocillos que permite la eliminación de los reactivos aplicando un vacío. Esto permite el conveniente intercambio de tampones, si el tampón requerido para el ligando específico de compuestos ligantes es distinto al tampón requerido para la generación de oxígeno singlete o separación. Por ejemplo, en el caso de compuestos ligantes basados en anticuerpos, se requiere un tampón de alto contenido en sal. Si se emplea la separación electroforética de las etiquetas liberadas, se obtiene un mejor rendimiento cambiando el tampón por uno con una concentración de sal menor, adecuado para electroforesis.

Como ejemplo, una sonda de escisión puede comprender un anticuerpo haptenado primario y una proteína ligante antihapteno secundaria derivatizada con múltiples moléculas de fotosensibilizador. Un anticuerpo haptenado primario preferido es un anticuerpo biotinilado, y proteínas ligantes antihapteno secundarias preferidas pueden ser un anticuerpo antibiotina o estreptavidina. Otras combinaciones de tales reactivos primarios y secundarios son bien conocidas en la técnica. Ejemplos de combinaciones de tales reactivos son propuestos por Haugland, 2002, Handbook of Fluorescent Probes and Research Reagents, Novena Edición, Molecular Probes, Eugene, OR. A continuación se describe un ejemplo de combinación de tales reactivos. En él, compuestos ligantes con etiquetas liberables ("mT₁" y "HiT₂"), y anticuerpos primarios derivatizados con biotina se unen específicamente a distintos

epítomos de dímero de receptor en membrana. La proteína ligante específica de biotina, ej., estreptavidina, se fija a la biotina llevando a múltiples fotosensibilizadores a una proximidad efectiva de los compuestos ligantes. La proteína ligante específica de biotina puede ser también un anticuerpo anti-biotina, y los fotosensibilizadores pueden ser fijados vía un grupo amina libre sobre la proteína mediante químicas de acoplamiento convencionales, ej., Hermanson (supra). Un ejemplo de fotosensibilizador para tal uso es un éster NHS de azul de metileno preparado como se divulga en la Solicitud de Patente Europea publicada 0510688.

El siguiente debate general sobre métodos, condiciones específicas y materiales es a efecto de ilustración y no de limitación. Un experto en la técnica entenderá cómo se pueden adaptar los métodos descritos aquí a otras aplicaciones, en especial utilizando muestras, tipos celulares y complejos diana distintos.

En la realización de los métodos de la invención, se lleva a cabo una combinación de los componentes del ensayo, incluyendo la muestra a estudiar, los compuestos ligantes y opcionalmente la sonda de escisión. En general, los componentes del ensayo pueden ser combinados en cualquier orden. En determinadas aplicaciones, no obstante, el orden de la adición puede ser importante. Por ejemplo, se puede querer monitorizar la unión competitiva, como en un ensayo cuantitativo. O se puede desear monitorizar la estabilidad de un complejo ensamblado. En tales aplicaciones, las reacciones pueden ser ensambladas por etapas.

Las cantidades de cada reactivo pueden determinarse en general empíricamente. La cantidad de muestra utilizada en un ensayo vendrá determinada por el número previsto de complejos diana presentes, y los medios de separación y detección utilizados para monitorizar la señal del ensayo. En general, las cantidades de los compuestos ligantes y de la sonda de escisión pueden ser proporcionadas en exceso molar en relación con la cantidad esperada de moléculas diana en la muestra, en general con un exceso molar de por lo menos alrededor de 1,5, preferentemente más o menos un exceso de 10 veces o más. En aplicaciones específicas, la concentración usada puede ser superior o inferior, dependiendo de la afinidad de los agentes ligantes y el número esperado de moléculas diana presentes en una célula individual. Cuando se determina el efecto de un compuesto químico en la formación de complejos de superficie celular oligoméricos, el compuesto puede ser añadido a las células antes, simultáneamente con o tras la adición de las sondas, dependiendo del efecto a monitorizar.

La mezcla del ensayo puede combinarse e incubarse en condiciones que permitan la unión de las sondas a las moléculas, habitualmente en medio acuoso, en general a un pH fisiológico (comparable al pH al que las células están en cultivos), mantenido por un tampón a una concentración en un rango de aproximadamente 10 a 200 mM. Pueden utilizarse tampones convencionales, así como también otros aditivos convencionales según sea necesario, tales como sales, medio de cultivo, estabilizadores, etc. Normalmente se emplean temperaturas fisiológicas y constantes. Las temperaturas de incubación oscilan normalmente de 4° a 70°C, habitualmente de 15° a 45°C aproximadamente, en general entre de 25° a 37°C.

Tras montar la mezcla de ensayo y la incubación para permitir a las sondas ligarse a las moléculas de superficie celular, la muestra puede tratarse para activar el agente de escisión para que escinda las etiquetas de los compuestos ligantes que se hallan en proximidad efectiva del agente de escisión, liberando la etiqueta correspondiente de la superficie celular en la solución. La naturaleza de este tratamiento dependerá del mecanismo de acción del agente de escisión. Por ejemplo, cuando se emplea un fotosensibilizador como agente de escisión, la activación de la escisión puede comprender irradiación de la mezcla a la longitud de onda de luz apropiada para el sensibilizador concreto utilizado.

Tras la escisión, la muestra puede ser analizada para determinar la entidad de las etiquetas que se han liberado. Cuando se aplica un ensayo empleando una pluralidad de compuestos ligantes, la separación de las etiquetas liberadas precede generalmente a su detección. Los métodos de separación y detección se determinan durante el proceso de diseño de las etiquetas para el ensayo. En un modo preferido de separación se emplea la electroforesis, en la que las diversas etiquetas se separan en base a diferencias conocidas en sus movilidades electroforéticas.

Como se ha mencionado más arriba, en algunas realizaciones, si las condiciones de reacción del ensayo pueden interferir con la técnica de separación empleada, puede ser necesario eliminar o cambiar el tampón de reacción del ensayo antes de la escisión y separación de las etiquetas moleculares. Por ejemplo, las condiciones del ensayo pueden incluir concentraciones de sal (ej. requeridas para una unión específica) que degraden el resultado de la separación cuando las etiquetas moleculares se separan en base a la movilidad electroforética. Así, esos tampones de alto contenido de sal pueden eliminarse, ej., antes de la escisión de las etiquetas moleculares, y sustituirse por otro tampón adecuado para la separación electroforética mediante filtración, aspiración, dilución u otros medios.

En determinadas realizaciones, se puede administrar al sujeto una terapia de combinación que incluya trastuzumab. La terapia de combinación puede incluir trastuzumab en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos conocidos por un experto en la técnica, sin limitación. De preferencia, el agente quimioterapéutico tiene un mecanismo de acción distinto al de trastuzumab. Por ejemplo, el agente quimioterapéutico puede ser un antimetabolito (ej., 5-fluorouracilo (5-FU), metotrexato (MTX), fludarabina, etc.), un agente antimicrotúbulo (ej., vincristina; vinblastina; taxanos como paclitaxel y docetaxel; etc.), un agente alquilante (ej., ciclofosfamida, melfalán, biscloroetilnitrosurea, etc.), agentes de platino (ej., cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, JM-216, CI-973, etc.), antraciclinas (ej., doxorubicina, daunorubicina, etc.), agentes antibióticos (ej., mitomicina-C, actinomicina D, etc.), inhibidores de la topoisomerasa (ej., etopósido, camptotecinas, etc.) o cualquier otro agente quimioterapéutico conocido por un experto en la técnica.

Ejemplos específicos de agentes quimioterapéuticos que pueden utilizarse en las diversas realizaciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, formas de dosificación y kits de la invención, comprenden, sin limitación, citarabina, melfalán, topotecan, fudarabina, etopósido, idarubicina, daunorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel y ciclofosfamida.

5 Otros agentes quimioterapéuticos que pueden ser utilizados incluyen abarelix, aldesleukina, alemtuzumab, alitretinoina, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, BCG vivo, bevacizumab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfan, calusterona, camptotecina, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucilo, cinacalcet, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, darbepoetin alfa, daunorubicina, denileukin diftotox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, dromostanolona, solución B de Elliott, epirubicina, epoetina alfa, estramustina, etopósido, exemestano, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumabozogamicina, gefitinib, goserelina, hidroxiaurea, ibritumomab tiuxetan, idarubicina, ifosfamida, imatinib, interferon alfa-2a, interferon alfa-2b, irinotecan, letrozol, leucovorina, levamisol, lomustina, mecloretamina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, methoxsalen, metilprednisolona, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, nandrolona, nifetumomab, oblimersen, oprelvekin, oxaliplatino, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegf[iota]grastim, pemetrexed, pentostatina, pipobroman, plicamicina, polifeprosan, porfimer, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, estreptozocina, talco, tamoxifen, tarceva, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, topotecan, toremifeno, tositumomab, trastuzumab, tretinoina, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, y zoledronato.

20 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto con un cáncer Her-2 positivo es improbable que responda al tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2, y/o es probable que el paciente presente un curso temporal corto. En determinadas realizaciones el método comprende la medición en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de una cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si el nivel de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es alto o muy alto, es improbable que el paciente responda a por lo menos un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2.

25 En determinadas realizaciones, puede comprender estratificar a los pacientes con Her-2 alto en dos grupos: muy alto y moderadamente alto. La estratificación puede comprender el uso de los niveles de Her-2 como se describe aquí. En algunas realizaciones el método puede comprender además la detección en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta, el grupo de pacientes vuelve a subdividirse (es decir, estratificarse) en expresores altos de Her-3 y expresores bajos de Her-3. En algunas realizaciones, el paciente con Her-2 y/u homodímeros de Her-2 moderadamente altos (es decir, medios) y Her-3 alto es menos probable que responda al agente anti-Her-2, y/o el paciente tenga un curso temporal largo que un paciente con Her-2 y/u homodímeros de Her-2 moderadamente altos (es decir, medios) y Her-3 bajo. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos de la presente invención, una expresión alta de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq$ aproximadamente 1,14-1,125. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, la expresión alta de Her-2 comprende una expresión que es muy alta y/o moderadamente alta. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, la expresión muy alta de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq$ aproximadamente 1,84 -2,21. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados aquí, la expresión moderadamente alta se sitúa entre 1,14 - 1,25 y 1,84-2,21. O se pueden utilizar otros rangos, dependiendo de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que esté siendo monitorizado.

30 En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O se puede monitorizar cualquier cáncer que pueda ser sensible a un agente anti-Her-2. El agente anti-Her-2 puede ser cualquier agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es uno de los agentes descritos aquí. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es paclitaxel.

35 En determinadas realizaciones, se mide una cantidad de Her-2. En determinadas realizaciones se mide una cantidad de homodímeros de Her-2. En determinadas realizaciones, si el Her-2 es medio, se mide una cantidad de Her-3. En determinadas realizaciones, si el Her-2 es moderadamente alto (es decir, medio), se mide una cantidad de homodímeros de Her-3 y/o heterodímeros de Her-2/Her-3. En determinadas realizaciones, la cantidad de Her-2 y/o Her-3 se mide utilizando un ensayo capaz de medir y/o cuantificar una cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra. En determinada realización, el ensayo es el VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST u otros criterios de respuesta.

40 En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto con un cáncer Her-2 positivo es probable que responda al tratamiento con por lo menos un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el método comprende medir en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto una cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si el nivel de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es bajo, es probable que el paciente responda por lo menos a un agente quimioterapéutico además del agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPEs. En determinadas realizaciones, el cáncer

del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En algunas realizaciones, el cáncer de mama es cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante). O puede ser monitorizado cualquier cáncer que pueda ser sensible a un agente anti-Her-2. El agente anti-Her-2 puede ser cualquier agente anti-Her-2. En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es uno de los agentes que se describen aquí. Por ejemplo, en determinadas realizaciones el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico adicional es paclitaxel. O pueden ser evaluados otros agentes quimioterapéuticos adicionales conocidos en la técnica y/o divulgados aquí. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta o curso temporal se mide respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o aplicando los criterios RECIST.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar si un sujeto con un cáncer Her-2 positivo es probable que responda a un agente anti-Her-2, y/o predecir si el curso temporal de la enfermedad será largo, y/o predecir si el sujeto presentará un evento significativo, comprendiendo el método la detección en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-2 y homodímeros de Her-2, y determinar el cociente de homodímeros de Her-2/ Her-2 total, donde el cociente del sujeto se determina que se hallará en uno de por lo menos 3 subgrupos, y si el cociente del sujeto está en el subgrupo bajo o alto, es probable que el sujeto responda al agente anti-Her-2, es probable que el sujeto presente un curso temporal largo y/o no es probable que el sujeto presente un evento significativo. En una realización preferida, los como mínimo tres subgrupos se determinan comparando el cociente homodímero de Her-2/ Her-2 total con el cociente de riesgo para poblaciones tratadas con versus sin un agente anti-Her-2, donde si el cociente de riesgo es inferior a 1, es más probable que el sujeto responda al agente anti-Her-2, es más probable que el paciente presente un curso temporal largo y/o es menos probable que el paciente presente un evento significativo.

Por ejemplo, el cociente H2D/H2T, la expresión de Her-2 (H2T) y los niveles de homodímeros de Her-2 (H2D) fueron examinados también respecto a la respuesta a trastuzumab en el ensayo clínico FIN HER, que fue diseñado para comprobar la eficacia de trastuzumab en el contexto del estadio precoz (es decir, adyuvante). H2T, H2D y H2D/H2T fueron comparados con IHC, CISH y los resultados clínicos en el estudio. Dado que la positividad de Her-2 por IHC o FISH se ha demostrado que se correlaciona con un pronóstico adverso y mejores resultados clínicos con trastuzumab, se preveía la capacidad de distinguir entre probables respondedores y no respondedores con un ensayo cuantitativo, tal como el ensayo HERMark. No obstante, tal como se demostró por el análisis multivariado de Cox de riesgos proporcionales, ni H2T ni H2D se correlacionaron significativamente con los resultados. Por otra parte, H2D/H2T estuvo asociado independientemente con el tiempo hasta cualquier recurrencia (TAR) y casi significativamente asociado con el tiempo hasta la recurrencia distante (TDR). Debido a estos resultados, se realizó el análisis STEPP (subpopulation treatment effect pattern plot) para examinar los cocientes de riesgo para pacientes tratados versus control en las distribuciones de H2T, H2D y H2D/H2T. Se utilizaron subpoblaciones de 80 pacientes para estos análisis. Mientras ni H2D ni H2T identificaron a ningún grupo de pacientes que no se beneficiaron con trastuzumab, se demostró que H2D/H2T discriminaba entre grupos de pacientes que respondían a trastuzumab y grupos de pacientes que no respondían a trastuzumab. Este último grupo tiene cocientes H2D/H2R intermedios que quedan entre un grupo de cociente H2D/H2T bajo, y un grupo con cociente H2D/H2T alto. Aunque los solicitantes no desean quedar limitados a una teoría mecanicista, una posible explicación para esta observación es que H2D/H2T es una medida de la activación de Her-2 en tumores de mama, y por consiguiente es un biomarcador de pronóstico para pacientes Her-2 positivos en el contexto de un estadio precoz (es decir, adyuvante) a quienes no se administra trastuzumab, y un biomarcador predictivo del grado de beneficio clínico que experimentan los pacientes al ser tratados con trastuzumab en el estadio precoz (es decir, adyuvante).

En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es metastásico o estadio precoz primario (es decir, adyuvante). En determinadas realizaciones, el agente actuante Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, Her-2, homodímeros de Her-2, Her-3, homodímeros de Her-3, y heterodímeros de Her-2/Her-3 se detectan utilizando el ensayo VERATAG®. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta, la probabilidad de presentar un curso temporal largo y/o la probabilidad de tener un evento significativo se mide como un índice de supervivencia global, tiempo hasta la progresión, tiempo hasta la recurrencia distante y supervivencia libre de enfermedad y/o respuesta o beneficio clínico utilizando los criterios RECIST. En determinadas realizaciones, se determina si el cáncer es Her-2 positivo mediante IHC, FISH o CISH. En otras realizaciones, la invención se refiere a un método que comprende determinar si el cociente homodímeros de Her-2/ Her-2 total es bajo, intermedio o alto comparando el cociente homodímeros de Her-2/ Her-2 total del cáncer del sujeto con puntos de corte óptimos. Y en otras realizaciones, si el cociente homodímeros de Her-2/ Her-2 total es intermedio y/o el cociente de riesgo es igual o superior a 1, es menos probable que el paciente responda a un agente anti-Her-2, y/o es menos probable que el paciente presente un curso temporal largo y/o es más probable que el paciente tenga un evento significativo.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto con cáncer. En un aspecto, los métodos comprenden determinar que el sujeto sufre un cáncer que es probable que responda al tratamiento con un agente actuante Her-2 y/o presenta un curso temporal largo, según un método de la invención, y administrar una cantidad efectiva de un agente anti Her-2 al sujeto como resultado de dicha determinación. En otro aspecto, los métodos comprenden determinar si un sujeto sufre un cáncer que es probable que responda al tratamiento con un agente anti-Her-2, y/o presenta un curso temporal largo según un método de la invención, y asesorar a un profesional médico sobre la opción de tratamiento de administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente anti-

Her-2. En otro aspecto, los métodos comprenden determinar si un sujeto sufre un cáncer que presente un corto curso temporal y/o es improbable que responda a un agente quimioterapéutico además de un agente anti-Her-2. Cada uno de estos aspectos comprende una de las diversas realizaciones (ej., estratificación por expresión de Her-2 y otros marcadores como se divulga aquí; evaluación de varios agentes anti-Her-2 y/u otros agentes quimioterapéuticos, análisis de varios tipos de cáncer). En determinadas realizaciones, el agente anti-Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es paclitaxel. En determinadas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico o estadio precoz primario (es decir, adyuvante).

Ejemplos

Ejemplo 1 : Anticuerpos. Anticuerpo VERATAG®, Biotina y Tijeras Moleculares

Los anticuerpos monoclonales, Ab8 contra el dominio citoplásmico de HER2, y Ab 15 contra el C-terminal de HER2, fueron adquiridos a Lab Vision. Reporters de VERATAG® (Proll y Pro 14) y azul de metileno conjugado con estreptavidina ("tijeras moleculares") se sintetizaron y purificaron de acuerdo con el protocolo descrito previamente (ver, por ejemplo, más arriba y la Patente EE.UU 7 105 308). Se prepararon conjugados anticuerpo- VERATAG® y anticuerpo-biotina, es decir, Ab8-Proll y Ab15-biotina, utilizando sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) como enlace, de acuerdo con el protocolo del fabricante, y productos de conjugación purificados por HPLC (Agilent).

Ejemplo 2: Cultivo Celular, Fijación, Procesado e Inclusión en Parafina

Se adquirieron cuatro líneas celulares de cáncer de mama, MDA-MB-468, MCF-7, MDA-MB-453 y SKBR-3, de American Type Cell Culture Collection. Todas las líneas celulares fueron mantenidas a 37°C y 5 % CO₂ en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM): F12 (50:50), 10% FBS, 1% PSQ (10 % suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomomicina) y 2mM L-glutamina. Las células fueron cultivadas casi en confluencia, en por lo menos diez placas de cultivo de 150 mm por cada línea celular. Tras eliminación del medio, las células fueron lavadas una vez con 1xPBS frío y se añadió 15 ml de 10 % NBF (formalina tamponada neutra) a cada placa. Las células fueron fijadas durante la noche(>16 hrs) a 4°C. Tras la eliminación de la solución de fijación, las células fueron recogidas raspando con solución fijadora residual y centrifugadas a 3200xg durante 15 min. El pellet celular fue transferido a un anillo tórico de goma, envuelto en papel de filtro y colocado en una casete de procesado. Se utilizó un procesador automático Tissue-Tek para el procesado. Resumiendo, el pellet celular se expuso a concentraciones crecientes de alcohol, Clear-rite (sustituto de xileno) y parafina. Tras el procesado, el pellet fue incluido en un bloque utilizando una estación de inclusión en parafina. Todos los disolventes utilizados para el procesado del pellet celular se obtuvieron de Richard-Allen Scientific.

Ejemplo 3: Tejidos Mamarios, Fijación, Procesado e Inclusión en Parafina

Se adquirieron tejidos mamarios congelados con distintos niveles de expresión de Her-2 de Biooptions. Los trozos de tejido (0,9-1,9 gramos) se fijaron en 10% NBF durante 24 hrs a 4°C, y procesados e incluidos en parafina como se describe para los pellets de línea celular.

Ejemplo 4: Microtomía

Se cortaron secciones de 7 um de grosor con un micrótopo (LEICA) y se colocaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente (VWR) con número de serie etiquetado. Los portaobjetos se secaron con aire durante 30 min y luego se cocieron en horno caliente a 60°C durante 1 hr. Todos los portaobjetos de muestra fueron conservados a 4°C para futuro ensayo.

Ejemplo 5: Inmunohistoquímica y Tinción H&E

La inmunohistoquímica para Her-2 fue realizada con el sistema Ventana Discovery XT, siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo primario contra Her-2 (CB 11) y otros reactivos fueron adquiridos a Ventana. La tinción H&E de tejidos de mama FFPE fue realizada de acuerdo con un protocolo estándar.

Ejemplo 6: Ensayo Her-2 VERATAG® Fijado en Formalina, Líneas Celulares y Tejido Mamario Incluidos en Parafina

Muestras de FFPE fueron desparafinizadas/rehidratadas utilizando una serie de disolventes. Resumiendo, los portaobjetos fueron empapados secuencialmente en xileno (2x, 5 min), 100 % etanol (2x, 5 min), 70 % etanol (2x, 5 min) y agua desionizada (2x, 5 min). La recuperación por calor del epítipo de las muestras rehidratadas se llevó a cabo en una cubeta conteniendo 250 ml de 1x tampón citrato (pH 6,0) (Lab Vision) utilizando un horno microondas (Spacemaker II, GE): 3 min a una potencia de 10, seguido 10 min a una potencia 3. Tras dejarlo enfriar durante 20 min a temperatura ambiente, los portaobjetos fueron aclarados una vez con agua desionizada. Se trazó un círculo hidrofóbico con un lápiz hidrofóbico sobre el portaobjetos utilizando un lápiz hidrofóbico (Zymed) para retener los reactivos en los portaobjetos. Las muestras fueron entonces bloqueadas para 1hr con tampón bloqueante conteniendo suero de ratón al 1 %, 1,5 % BSA y una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche) in 1 xPBS. Tras eliminación del tampón bloqueante por aspiración, se añadió una mezcla de anticuerpos conjugados con biotina y VERATAG® (ambos a una concentración de 4ug/m) preparada en tampón bloqueante, y se incubaron durante la noche las reacciones de unión en una cámara humidificada a 4°C con agitación. La mezcla de anticuerpos fue aspirada y las muestras se lavaron con tampón de lavado conteniendo 0,25% TritonX-100 en 1 xPBS y se

añadió azul de metileno conjugado con estreptavidina a una concentración de 2,5ug/ml en 1 xPBS. Las concentraciones del anticuerpo y los conjugados estreptavidina-fotosensibilizador fueron optimizados todos en base a la especificidad de señal y el rango dinámico de lectura del ensayo utilizando muestras de línea celular y tejido mamario. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, el reactivo estreptavidina-azul de metileno fue aspirado y se lavaron las muestras en tampón de lavado una vez, seguido por 3 cambios de agua desionizada. Se añadió a las secciones de la muestra tampón de iluminación conteniendo 3 pM fluoresceína y dos marcadores internos CE (MF y ML) en 0,01 xPBS. La unión VERATAG® fue liberada a ~4°C por escisión fotoactivada utilizando un dispositivo iluminador LED propio equipado con un cubo de hielo electrónico (Torrey Pine Scientific). La muestra CE conteniendo los reporters VERATAG® liberados fue recogida de encima de la sección de tejido en los portaobjetos y los reporters VERATAG® liberados en las muestras CE se separaron y detectaron con un instrumento ABI3100 CE (dispositivo capilar de 22 cm) (Applied Biosystems) en condiciones de inyección de CE de 6k V 50 seg a 30°C.

Ejemplo 7: Análisis de los Datos

La identificación y cuantificación de VERATAG® se llevó a cabo utilizando software VERATAG® Informer (ver, por ejemplo, la publicación EE.UU Nº 2007/0203408-A1, que se incorpora aquí como referencia, incluyendo dibujos). Para analizar las señales VERATAG® en un electroferograma CE en crudo se utilizaron dos marcadores internos CE, MF (primer marcador) y ML (último marcador) para identificar los picos de VERATAG® según su movilidad electroforética o tiempo de migración, t , relativo a los dos marcadores, es decir, $[t(\text{VERATAG}®)-t(\text{MF})]/[t(\text{ML})-t(\text{MF})]$. Los picos de VERATAG® identificados fueron cuantificados entonces por cálculo de área de pico para cada VERATAG(R). Como corrección por la variabilidad en la recuperación de VERATAG® de la sección de tejido, y la variabilidad de ejecución en la eficiencia de la inyección de CE y/o la sensibilidad de detección en el dispositivo capilar, se incluyó fluoresceína (3 pM) en la iluminación, y tampón de recuperación VERATAG®, con co-electroforesis como control de referencia interno en cada ciclo de muestra. El área de cada pico de VERATAG® se reporta entonces como RFU o RPA por normalización de área del pico de VERATAG® (área de pico de VERATAG®) al pico de fluoresceína interno (área de pico de fluoresceína/1 pM) y con unidades de concentración (pM). Los términos de cuantificación finales para la proteína diana detectada por el ensayo VERATAG® pueden ser RPA (pM) para muestras similares, o el $\text{RPA} \cdot \text{IB vol/TA}$ para muestras de tumor variables (=área de pico relativa multiplicada por el volumen del tampón de iluminación (IB) cargado en la sección de muestra; dividido por el área del tumor en mm^2) ($\text{RPA} \cdot \text{IB vol/TA} = \text{pmole/L} \cdot \text{L/mm}^2 = \text{pmole/mm}^2$).

Ejemplo 8: Titulación del Tamaño de la Sección de Muestra y Estimación del Área del Tumor

Para evaluar la capacidad del ensayo VERATAG® para cuantificar las proteínas diana en el mismo espécimen de muestra, se procedió a la titulación serial del tamaño de la sección de las muestras de línea celular cortadas a 7 µm sobre portaobjetos, utilizando una hoja de afeitar, y se capturaron diferentes números de secciones de tejido mamario cortadas con micrótopo sobre un portaobjetos para cada titulación del material tisular. Tras el ensayo VERATAG®, los portaobjetos de línea celular fueron secados con aire y fotoescaneados. El área de sección de las muestras en mm^2 fue medida y calculada sobre las imágenes escaneadas utilizando ImageJ software. Para la muestra de tejido tisular mamario, los portaobjetos post-ensayo VERATAG(R) fueron teñidos con H&E y montados con un medio de montaje (Richard- Allan Scientific). El contenido tumoral de las muestras del tejido fue definido por un patólogo certificado utilizando un rotulador, y el área del contenido tumoral en mm^2 fue medida y calculada con el software ImageJ del mismo modo que en las muestras de línea celular.

Ejemplo 9: Desarrollo del Ensayo VERATAG® para Células FFPE

En la Figura 1 se presenta un esquema del ensayo VERATAG® FFPE. Antes del inicio del ensayo se generaron secciones de micrótopo FFPE de líneas celulares o tejidos tumorales de cáncer de mama humano, y se hornearon en portaobjetos de vidrio como se ha descrito antes. Las secciones de línea celular o tejido tumoral FFPE fueron desparafinizadas y rehidratadas siguiendo protocolos estándar xileno/etanol/agua, y luego se sometieron a recuperación de antígeno inducida por calor seguida por el ensayo VERATAG®. El ensayo VERATAG(R) se inició por la adición del par de anticuerpos conjugado a VERATAG(R) y conjugado a biotina, seguido por lavado e incubación con un fotosensibilizador (SA-azul de metileno, o SA-MB) conjugado a estreptavidina. Las secciones de línea celular y de tumor fueron expuestas a iluminación de luz a 670 nm, durante la cual el fotosensibilizador ligado al anticuerpo de biotina convirtió el oxígeno disuelto en un oxígeno en estado singlete más reactivo (O_2) en solución tampón. Esto se produce vía absorción, cruce entre sistemas y producción de O_2 .

Las moléculas O_2 son de vida corta (~4 µs en agua) y por tanto tienen una media de distancia de difusión limitada, ej., el 50 % del O_2 producido se difundirá ~80 nm y < 0,1 % se difundirá 250 nm antes de ser inactivado (Latch, Science, 2006). Por consiguiente, el O_2 que se difunde reacciona con el enlace covalente entre la molécula reporter VERATAG® y el anticuerpo, lo que conduce a la escisión basada en la proximidad de las uniones tio-éter y liberación de moléculas reporter VERATAG® ligadas a las células tisulares (Ver ej., Figuras 2A y 2B). Aplicado a instrumentos de electroforesis capilar (CE) convencional, el reporter VERATAG® liberado es separado de acuerdo con sus propiedades de migración y detectado como un pico de fluorescencia en un electroferograma, que puede ser identificado y cuantificado como el área de pico utilizando software VERATAG® Informer. Por tanto, el área de pico de la molécula reporter fluorescente VERATAG® es directamente proporcional a la cantidad de antígeno diana presente en las células. El área de pico VERATAG® se calcula inicialmente en RFU. Para corregir la señal

VERATAG® respecto a la variación en recuperación de las secciones tisulares e inyección en CE, el área de pico (RPA) se calcula en relación con la de una concentración conocida de fluoresceína estándar interno.

5 Para identificar un par de proximidad de anticuerpos de Her-2 adecuados para el desarrollo del ensayo VERATAG® , se conjugaron cinco anticuerpos con grupos reporter fluorescentes VERATAG® o biotina, y diez pares de proximidad fueron comprobados a 1 ug/ml cada uno en líneas celulares de tumor de mama humano preparadas FFPE. El rendimiento de cada par de anticuerpos fue evaluado por su capacidad de ser paralelos a los niveles de expresión de proteína Her-2 relativos, determinados por análisis FACS y otros métodos independientes en SK-BR-3 (6 x 10⁵ por célula), MDA-MB-453 (1.5 x 10⁵ por célula); BT-20 (6 x 10⁴ por célula); MCF-7 (2 x 10⁴ por célula), y 10 células MDA-MB-468 (control negativo; <10⁴ por célula). El par de anticuerpos de Her-2 Ab1 y Ab8 generaron el mayor rango dinámico de señal, consistente con el nivel de expresión de Her-2 relativo cuantificado por otros métodos. En la Figura 3 se muestran electroferogramas representativos de la señal VERATAG® generada por cuatro líneas celulares de cáncer de mama FFPE bien caracterizadas, junto con micrografía IHC de Her-2 paralelas utilizando desarrollo de color DAB. El área de pico del VERATAG® generada por el ensayo VERATAG® Her-2 es paralela a la intensidad de señal IHC y es consistente con las categorías de test IHC aceptadas del nivel de 15 expresión de Her-2 (HercepTest: SK-BR-3 = 3+; MDA-MB-453 = 2+; MCF-7 = 0-1+; MDA-MB-468 = 0).

Ejemplo 10: Anticuerpo VERATAG(R) y Optimización del Ensayo

Tras identificar un par de anticuerpos adecuados para el desarrollo del ensayo VERATAG® en el formato de proximidad, se determinó la afinidad y especificidad relativas para los anticuerpos individuales, en condiciones de liberación directa de no proximidad de VERATAG(R), así como un K_{1/2} y concentraciones de saturación en 20 condiciones de proximidad. Se realizaron titulaciones de anticuerpos con conjugado de VERATAG® Ab8-Prol 1 o Ab15-Prol 1 en líneas celulares FFPE con expresión de Her-2 positiva (SKBR-3) y negativa (MDA-MB-468) utilizando una concentración desaturación. (200 uM) del sensibilizador O₂ azul de metileno para la liberación de VERATAG®. Esta liberación de no proximidad de Pro 11 VERATAG® de concentraciones crecientes de anticuerpo ligado refleja la afinidad relativa del anticuerpo. El resultado que coincide con la curva multiparámetro de Ab8-Pro 11 es más 25 consistente con un único punto de unión de K_D = 6-8ug/ml (40-50nM) y similar a la unión de punto único de Ab 15-Pro 11 con un K_D de 2-3ug/ml (12-18nM). La unión no específica de Ab8-Pro 11 puede ser calculada a partir del control negativo MDA-MB-468 como <4 % de la señal total SK-BR-3, mientras que la unión no específica de Ab 15-Pro 11 se calcula que es del -10 %.

Las concentraciones óptimas de Ab8-Pro11 y Ab15-biotina para el ensayo de proximidad de Her-2 total fueron 30 determinadas mediante titulaciones de anticuerpos en líneas celulares y muestras de tumor mamario humano FFPE. Las concentraciones de ambos anticuerpos se mantuvieron iguales durante la titulación de 0,25ug/ml o 8ug/ml. Un K_j 12 de señal máxima VERATAG® igual a aproximadamente 2ug/ml se observó para ambos anticuerpos, y una concentración de saturación se alcanzó a 3-4ug/ml. En este y otros estudios de titulación similares, el cociente óptimo señal/ fondo de 100-200 es 2-4ug/ml tanto para Ab8-Prol 1 como para Ab15-biotina. Experimentos adicionales 35 de optimización determinaron que la concentración del reactivo sensibilizador de O₂ SA- MB de 2.5ug/ml es de saturación en la mayoría de condiciones, y el tiempo de iluminación óptimo es de 2 horas. Considerando estos resultados, se eligió una concentración de 4ug/ml (26nM) tanto para Ab8-Pro 11 como para Ab15-biotina, y 2,5ug/ml para SA-MB, para la posterior optimización del ensayo y la caracterización del rendimiento.

Tres formatos de ensayo VERATAG® Her-2 fueron comparados a una concentración de anticuerpos de 4ug/ml, para 40 identificar las condiciones que dan como resultado el mejor rendimiento del ensayo. Son dos formatos de proximidad, consistentes en Ab15-biotina más Ab8-Pro11, y Ab8-biotina más Ab15-Pro 11, y la liberación directa de no proximidad de VERATAG® desde Ab8-Pro 11 en presencia de saturación de azul de metileno. Aunque el formato de liberación directa de azul de metileno proporciona la mayor señal global, ambos métodos de ensayo de proximidad dan como resultado un fondo inferior, mayor cociente señal/fondo y rango dinámico, y siguieron 45 más estrechamente el número de receptores esperados por célula determinado por métodos independientes. El formato de proximidad utilizando Ab15-biotina y Ab8-Prol 1 da como resultado el mejor cociente señal/fondo, y fue seleccionado como formato de ensayo final para el posterior estudio.

La muestra biológica donde la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es media fue nuevamente analizada 50 respecto a la expresión de Her-3 utilizando los métodos descritos más arriba. Así los expresores medios de Her-2 se estratificaron o clasificaron nuevamente por el nivel de los expresores de Her-3, alto o bajo.

Ejemplo 11: Aplicación de la clasificación de Her-2 y Her-3 en pacientes con cáncer de mama metastásico

Se realizó el ensayo VERATAG® en una cohorte de pacientes con MBC. Esta cohorte (N=103) se derivó del 55 International Serum Her2/neu Study Group (ISHSG) y es denominada la cohorte Lipton. Se realizó IHC en las pacientes en una localización central – la Universidad de Viena en Austria – por un único patólogo, donde las pacientes eran IHC 3+ o 2+/FISH positivo. De las 103 pacientes, 99 tuvieron mediciones FISH centrales, 98 tuvieron mediciones H2T, y 79 tuvieron mediciones H3T. De las 79 pacientes seleccionadas así, 3 fueron excluidas que eran FISH negativo con H2T ≥ 1,14. Así finalmente se sometió a ensayo un grupo final de 76 pacientes.

Fueron estudiados cinco grupos como sigue:

Grupo 1	FISH negativo	H2T < 1,14
Grupo 2	FISH positivo	H2T < 1,14
Grupo 3	FISH positivo	H2T ≥ 1,84
Grupo 4	FISH positivo	H2T ≥ 1,14, < 1,84, H3T alto
Grupo 5	FISH positivo	H2T ≥ 1,14, < 1,84, H3T bajo

5 Como se muestra en la Figura 4, el conjunto total de pacientes Her-2 positivo tuvieron una media de tiempo hasta la progresión (TTP) de 7,9 meses. En la Figura 5 se dan los datos de pacientes del Grupo 1, y presentan una media de TTP de 4,4 meses.

10 En la Figura 6 se presentan los datos de las pacientes del Grupo 2 que son FISH positivo y expresoras bajas de Her-2, y presentan una media de TTP para FISH negativo y H2T <1,14 de 4,4 meses, FISH positivo y H2T < 1,14 de 3,2 meses, y FISH positivo, y H2T ≥ 1,14 de 11,3 meses. En relación con el grupo FISH positivo, H2T ≥1,14, el grupo FISH negativo, H2T < 1.14 (HR=2,7; p=0,0002) y el FISH positivo, H2T < 1,14 (HR=2,9; p=0,004) presentaron peores resultados.

15 Los datos de las pacientes del Grupo 3 que son FISH positivo y expresoras altas de Her-2 se presentan en la Figura 7, y muestran un TTP para FISH positivo, y H2T ≥ 1,14 < 1,84 de 12,21 meses. Así, estos datos muestran que las pacientes que eran FISH positivo con H2T moderadamente alto (ej., pacientes con H2T ≥ 1,14 y < 1,84) tienen mejores resultados que las pacientes FISH positivo con H2T bajo (ej., H2T < 1,14) (HR=4,0; p=0,0002), las pacientes FISH negativo con H2T bajo (HR=3,5; p<0,0001) o las pacientes FISH positivo con H2T alto (ej., H2T > 1,84) (HR=3,0; p=0,0005).

20 Los datos de las pacientes de los Grupos 4 y 5 que son FISH positivo y expresoras altas de Her-2, y que además han sido estratificadas nuevamente según una expresión alta o baja de Her-3 se muestran en la Figura 8, y presentan una media de TTP para FISH positivo, y H2T ≥ 1,14, < 1,84 (ej., H2T moderadamente alto) y expresión alta de Her-3 de 7,4 meses y una media de TTP para FISH positivo, y H2T ≥ 1,14 < 1,84 (ej., H2T moderadamente alto) y una media de TTP para una expresión baja de Her-3 de 15,0 meses.

25 Para los 5 grupos, se da más abajo la media de TTP (meses) y el cociente de riesgo relativo a FISH negativo, H2T < 1,14:

	Media de TTP (meses)	Cociente de Riesgo (valor p) vs Grupo 1	Cociente de Riesgo (valor p) vs Grupo 5
Grupo 1	4,4	N/A	4,9 (<0,0001)
Grupo 2	3,2	1,1 (0,84)	5,7 (<0,0001)
Grupo 3	4	1,3 (0,53)	4,2 (<0,0001)
Grupo 4	7,4	0,53 (0,051)	3,1 (0,0003)
Grupo 5	15	0,2 (<0,0001)	N/A

30 Por tanto, los datos indican que un número significativo de pacientes tratadas con trastuzumab, en base a IHC, son FISH negativo y no respondieron al tratamiento. Un subgrupo de pacientes FISH positivo que tenían una expresión baja de Her-2 medida porHERmark, no respondieron al tratamiento con trastuzumab, mientras que otro subgrupo de pacientes FISH positivo que tenían una expresión de Her-2 muy alta medida por HERmark tampoco respondió al tratamiento con trastuzumab. El tercer subgrupo de pacientes FISH positivo que tenían una expresión moderadamente alta (ej. media) de Her-2, medida porHERmark, presentaron la mejor respuesta al tratamiento con trastuzumab.

35 El tercer subgrupo de pacientes FISH positivo que tenían una expresión de Her-2 moderadamente alta (ej. media) pudo ser nuevamente subdividido en base al nivel de la expresión de Her-3. Los datos demuestran que en el tercer subgrupo, las pacientes con una expresión alta de Her-3 (Grupo 4) tuvieron un TTP significativamente mayor (p=0,051) que las pacientes FISH negativo, con expresión baja de Her-2 (Grupo 1) y presentaron aproximadamente la mitad de riesgo de progresión. En contraste, las pacientes del tercer subgrupo, con expresión baja de Her-3 (Grupo 5) tuvieron la mejor respuesta de todos los subgrupos, con una reducción 5 veces mayor del riesgo en comparación con las pacientes FISH negativo, con expresión baja de Her-2 (Grupo 1), y tuvieron una respuesta significativamente mejor que las expresoras intermedias de Her-2 y altos de Her-3 (p=0,0003).

5 Por tanto, los datos demuestran que es posible determinar si es probable que un paciente con un cáncer Her-2 positivo responda al tratamiento con un agente anti-Her-2 y/o predecir el curso temporal de una enfermedad midiendo la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/u homodímeros de Her-2 es moderadamente alta (ej., media), se clasifica nuevamente a los pacientes midiendo la cantidad de Her-3. Los pacientes tratados con un agente anti-Her-2, y una expresión de Her-2 media, pero una alta expresión de Her-3 tendrán un TTP más largo, mientras que los pacientes con una expresión de Her-2 media, pero una expresión de Her-3 baja serán los que responderán mejor.

Ejemplo 12 Aplicación de la clasificación Her-2 y Her-3 en pacientes con cáncer de mama en estadio precoz (es decir, adyuvante)

10 FinHer (Joensuu et al, N Engl J Med 2006, J ClinOncol 2009) es uno de los varios ensayos clínicos prospectivos y aleatorizados que demuestran un beneficio clínico con la adición de trastuzumab a la quimioterapia en estadio precoz (es decir, adyuvante). Investigamos la relación existente entre el beneficio clínico de trastuzumab y la expresión cuantitativa de proteína Her-2 (H2T) determinada por el ensayo HERmark. Se incluyó tejido fijado con formalina, incluido en parafina (FFPE) de 899 casos de cáncer de mama invasivo, del estudio FinHer que tenían tejidos de tumor invasivo adecuados para el ensayo HERmark. 196 de ellos fueron Her-2-positivos por CISH. En este estudio, las pacientes con cáncer Her-2 positivo (n=232) fueron asignadas aleatoriamente para serles administrado trastuzumab concomitantemente con quimioterapia durante 9 semanas, o quimioterapia sola. En este estudio nos centramos en las pacientes con cáncer Her-2 positivo aleatorizadas entre tratamiento con trastuzumab o control. Se realizaron análisis de escaneado posicional para identificar el punto de corte óptimo separando al grupo de H2T muy alto. Como se muestra en la Figura 9, las pacientes con valores de H2T muy altos ($\log H2T \geq 2,21$; $>125,9$ unidades HERmark) no experimentaron beneficio con el tratamiento con trastuzumab más quimioterapia en relación con los controles (HR=1,23, P = 0,75 para TDR, HR=1,05, P = 0,95 para OS), mientras que aquellas con valores H2T $<125,9$ sí lo hicieron (HR=0,52, P = 0,05 para TDR, HR=0,48, P =0,1 para OS).

25 Si bien se ha ilustrado y descrito la realización preferida de la invención, se apreciará que se pueden efectuar varios cambios en ella sin alejarse del ámbito de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar si es probable que un sujeto con cáncer responda al tratamiento con un agente anti-HER-2, para predecir el curso temporal de la enfermedad y/o predecir la probabilidad de que se produzca un evento significativo en el curso temporal del cáncer del sujeto, donde el evento significativo es una reducción del tiempo transcurrido entre el diagnóstico de cáncer, y por lo menos uno de diagnóstico primario, progresión del cáncer de un estadio a otro más avanzado, progresión a enfermedad metastásica, recidiva, cirugía o defunción, comprendiendo los pasos de:
- (a) medición de la expresión de HER2 en una muestra biológica procedente del cáncer del sujeto;
- 10 (b) determinar si la muestra biológica presenta un nivel bajo de HER2, un nivel moderadamente alto de HER2, o un nivel muy alto de HER2, donde el nivel bajo comprende tener una cantidad de HER2 igual o inferior a un primer nivel umbral de HER2, el nivel moderadamente alto comprende una cantidad de HER2 superior al primer nivel umbral de HER2 e inferior a un segundo nivel umbral de HER2, y el nivel muy alto comprende una cantidad de HER2 superior o igual al segundo nivel umbral de HER2, y donde el segundo nivel umbral de HER2 es superior al primer nivel umbral de HER2;
- 15 (c) correlacionar la cantidad de HER2 medida en la muestra biológica con al menos uno de la probabilidad de que el sujeto responda al tratamiento con un agente anti-HER2, el curso temporal de la enfermedad y/o la probabilidad de que se produzca un evento significativo en el curso temporal del cáncer del sujeto;
- (d) indicar que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con un agente anti-HER2, más probable que presente un curso temporal de la enfermedad largo, y/o menos probable que se registre un evento significativo si la cantidad de HER2 en la muestra biológica es moderadamente alta, comparado con si la cantidad de HER2 es baja o muy alta.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, donde el método comprende además los pasos de:
- (e) medir la expresión de HER3 en la muestra biológica;
- (f) determinar si la cantidad de HER3 en la muestra biológica es baja o alta, donde un nivel bajo comprende una cantidad de HER3 inferior a un nivel umbral de HER3, y un nivel alto comprende una cantidad de HER3 igual o superior al nivel umbral de HER3;
- 25 (g) correlacionar la cantidad de HER3 medida en la muestra biológica con por lo menos uno de la probabilidad relativa de que el sujeto responda al tratamiento con un agente anti-HER2, el curso temporal de la enfermedad y/o la probabilidad de que se registre un evento significativo en el curso temporal del cáncer del sujeto; e
- 30 (h) indicar que es más probable que el sujeto responda al tratamiento con un agente anti-HER2, más probable que presente un curso temporal de la enfermedad largo, y/o menos probable que se registre un evento significativo si la cantidad de HER2 en la muestra biológica es moderadamente alta y la cantidad de HER3 es baja.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la expresión de HER2 comprende HER2 total y/u homodímeros de HER2.
- 35 4. El método de las reivindicaciones 2 o 3, donde la expresión de HER3 comprende HER3 total, homodímeros de HER3 o heterodímeros de HER3.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cáncer del sujeto comprende un carcinoma, un linfoma, un blastoma, un sarcoma o una leucemia.
- 40 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cáncer del sujeto comprende una cáncer de célula escamosa, un cáncer de pulmón, un cáncer gastrointestinal, un cáncer de páncreas, un glioblastoma, un cáncer cervical, un cáncer de ovario, un cáncer de hígado, un cáncer de vejiga, un hepatoma, un cáncer de mama, un cáncer de colon, un cáncer colorrectal, un carcinoma de endometrio, un carcinoma de glándula salival, un cáncer renal, un cáncer de próstata, un cáncer vulvar, un cáncer de tiroides, un carcinoma hepático y/o un cáncer de cabeza y cuello.
- 45 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cáncer del sujeto comprende cáncer metastásico o cáncer de mama en estadio precoz primario.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el cáncer comprende un cáncer HER2 positivo.
- 50 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde se mide la probabilidad de respuesta respecto al índice de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión, y/o usando los criterios de respuesta RECIST u otros.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sujeto es tratado con un agente anti-HER2.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el agente anti- HER2 comprende por lo menos uno de trastuzumab, lapatinib, AEE-788 o 4D5.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la muestra biológica comprende una muestra fijada con formalina e incluida en parafina (FFPE).
- 5 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad de HER2 y/o la expresión de HER3 es medida utilizando un ensayo VERATAG®, un ensayo FRET, un ensayo BRET y/o un ensayo de complementación biomolecular y de ligación de proximidad.
- 10 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad de la expresión de HER2 y/o HER3 se mide mediante un ensayo capaz de medir y/o cuantificar una cantidad de interacciones proteína-proteína en una muestra.
- 15 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la expresión de HER3 comprende heterodímeros de HER2/HER3.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad de la expresión de HER2 y/o HER3 se mide por contacto de la muestra biológica con un compuesto ligante específico para HER2 o HER3, donde cada compuesto ligante tiene una etiqueta molecular unida al mismo mediante un enlace escindible, y una sonda de escisión con un fracción inductora de escisión, y se detecta si la etiqueta molecular correspondiente al compuesto ligante específico para HER2 y/o HER3 es liberada.

FIGURA 1

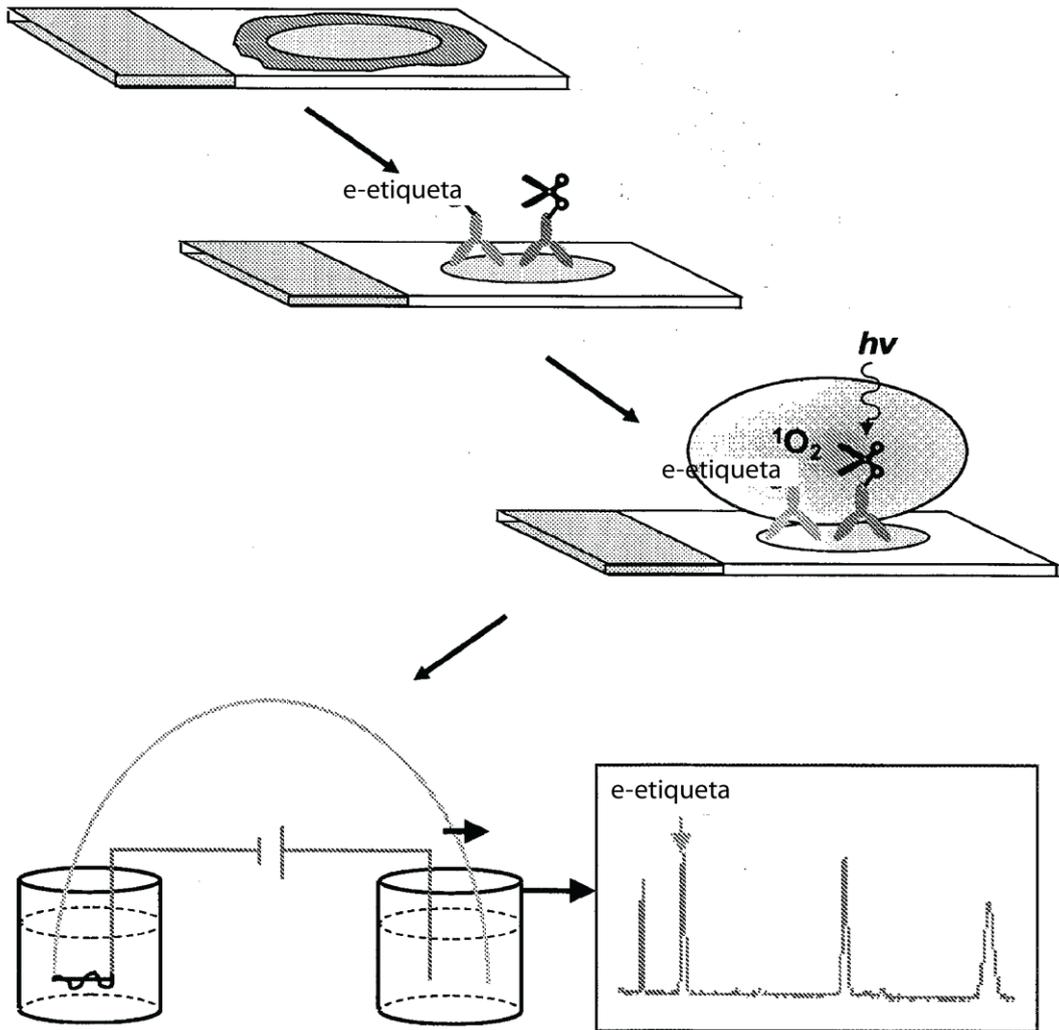


FIGURA 2A

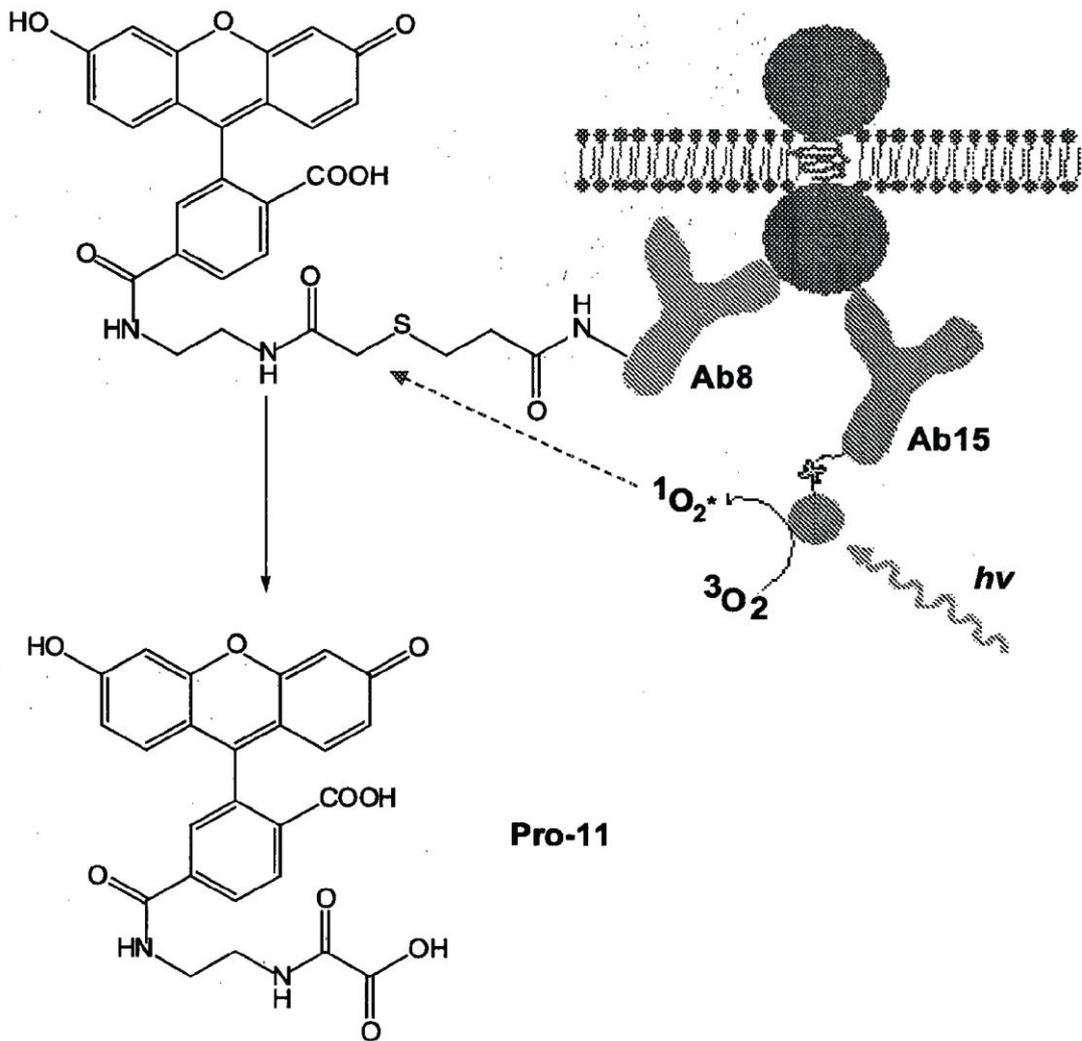


FIGURA 2B

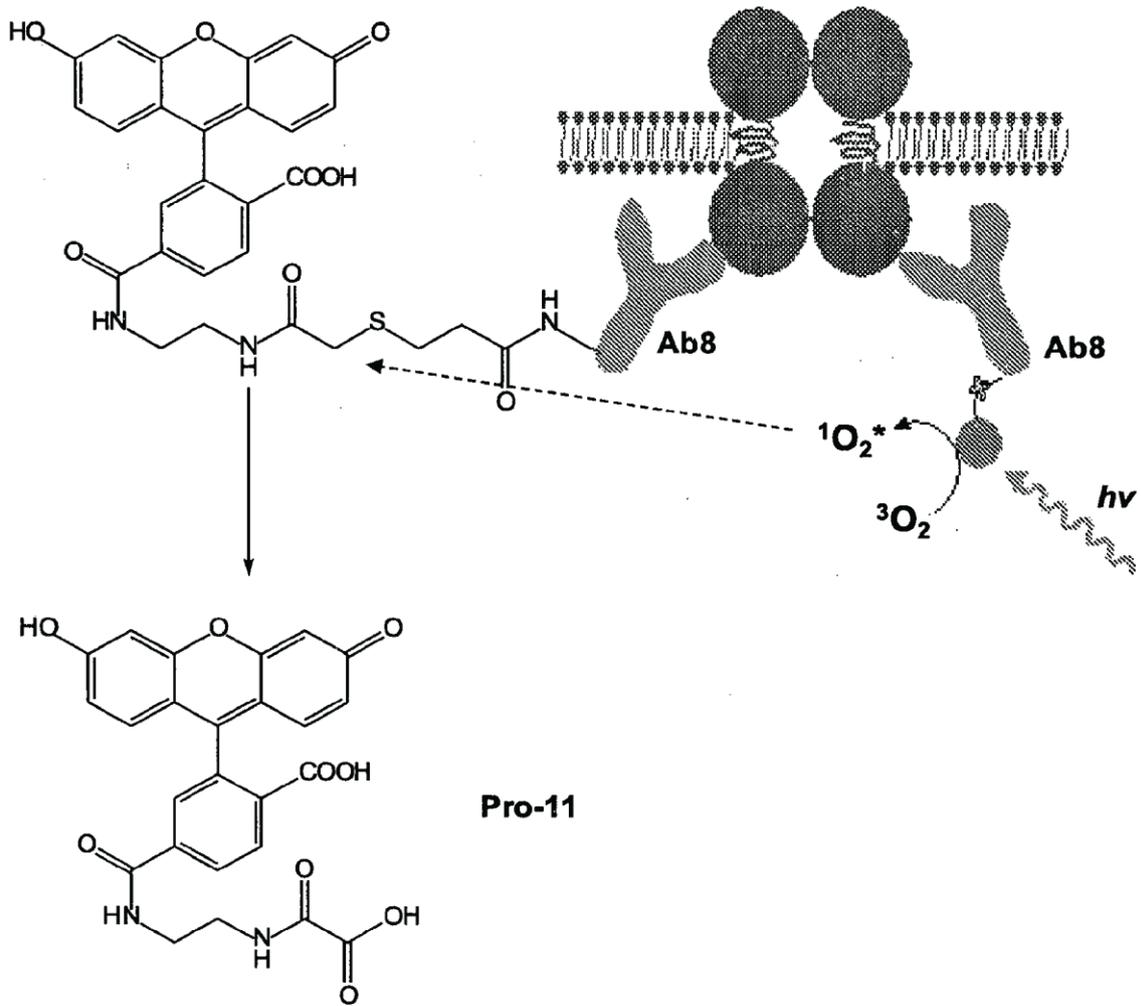


FIGURA 3

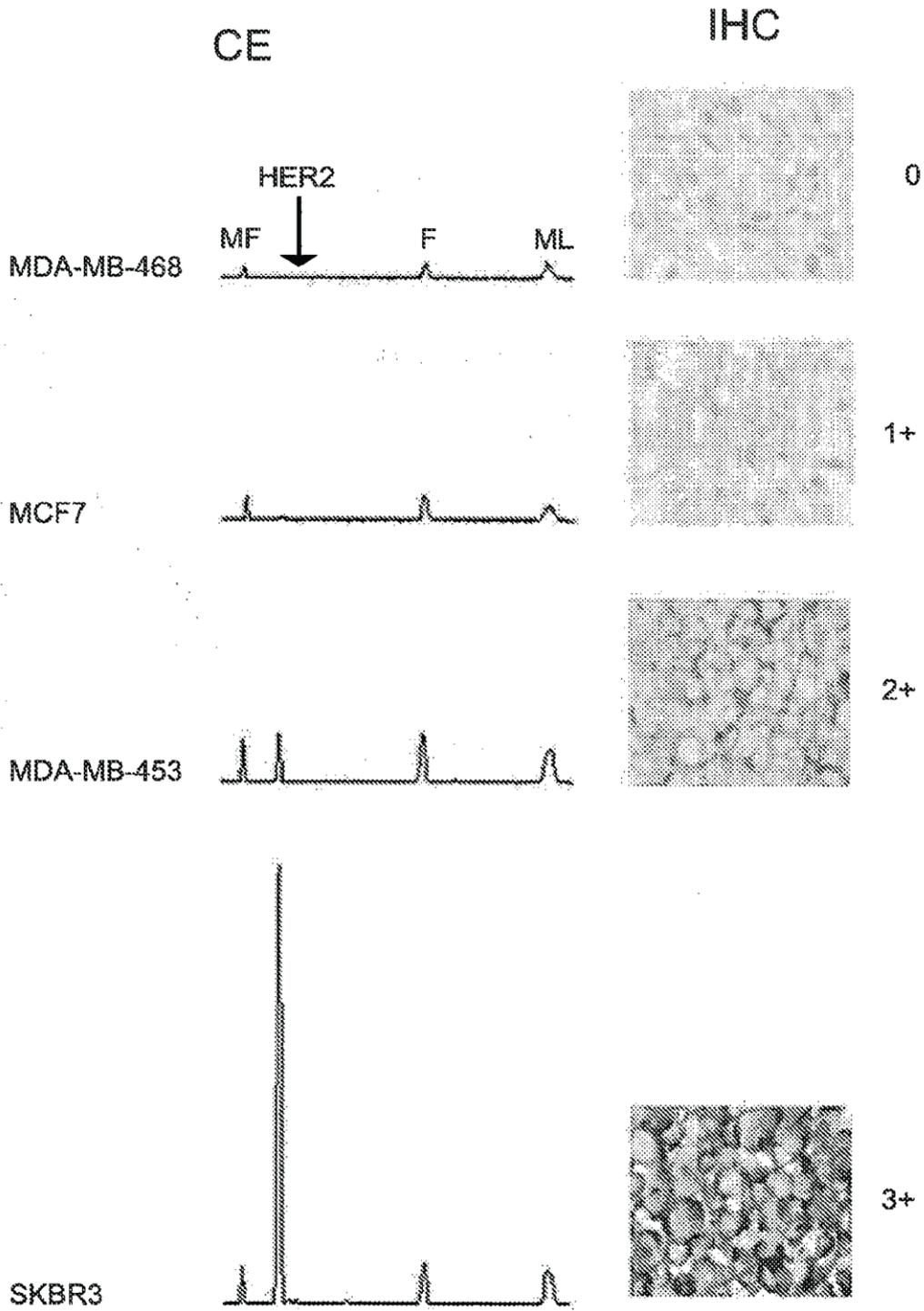


FIGURA 4

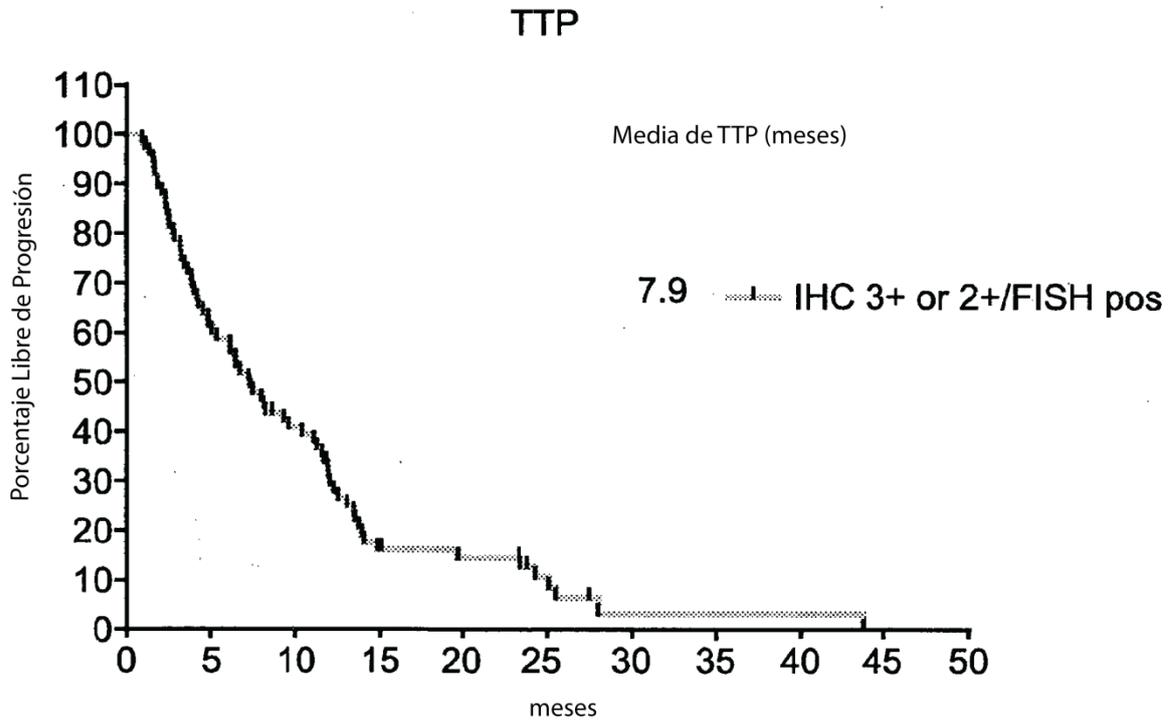


FIGURA 5

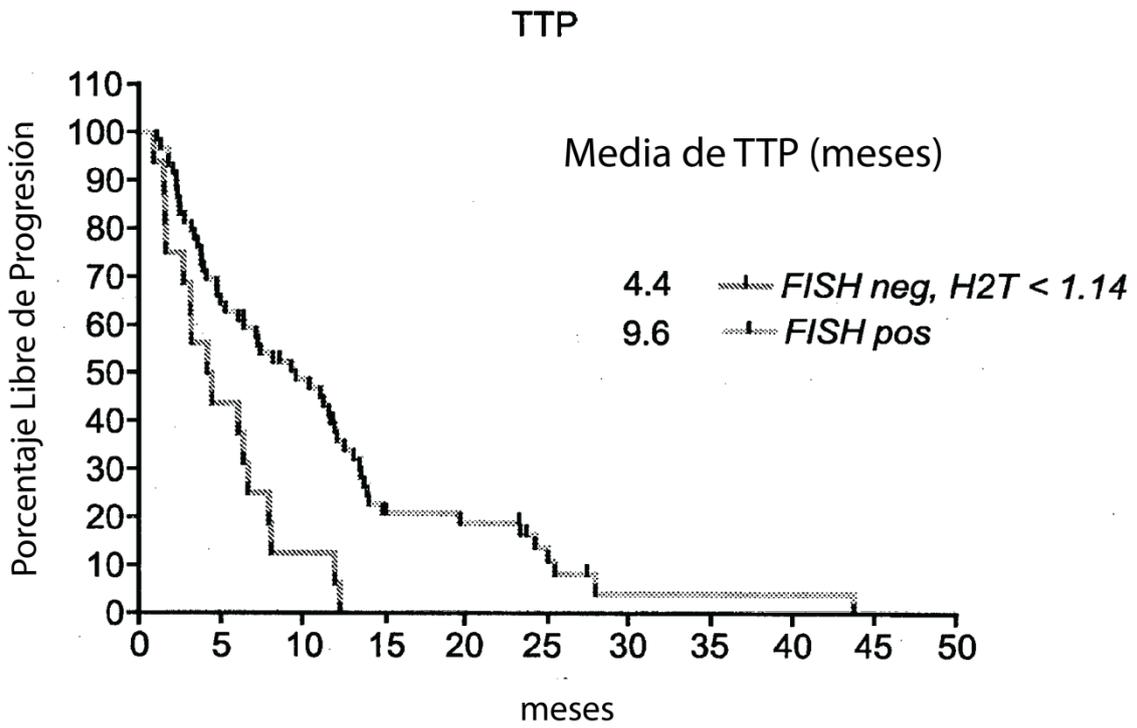


FIGURA 6

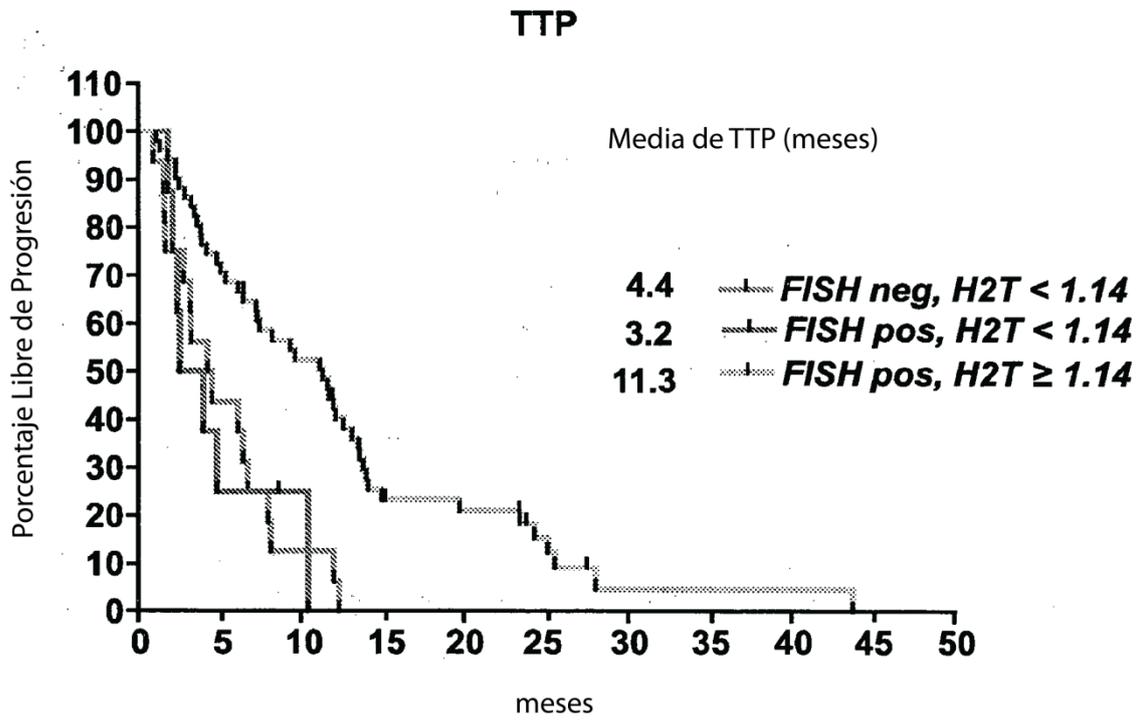


FIGURA 7

Tiempo hasta la progresión

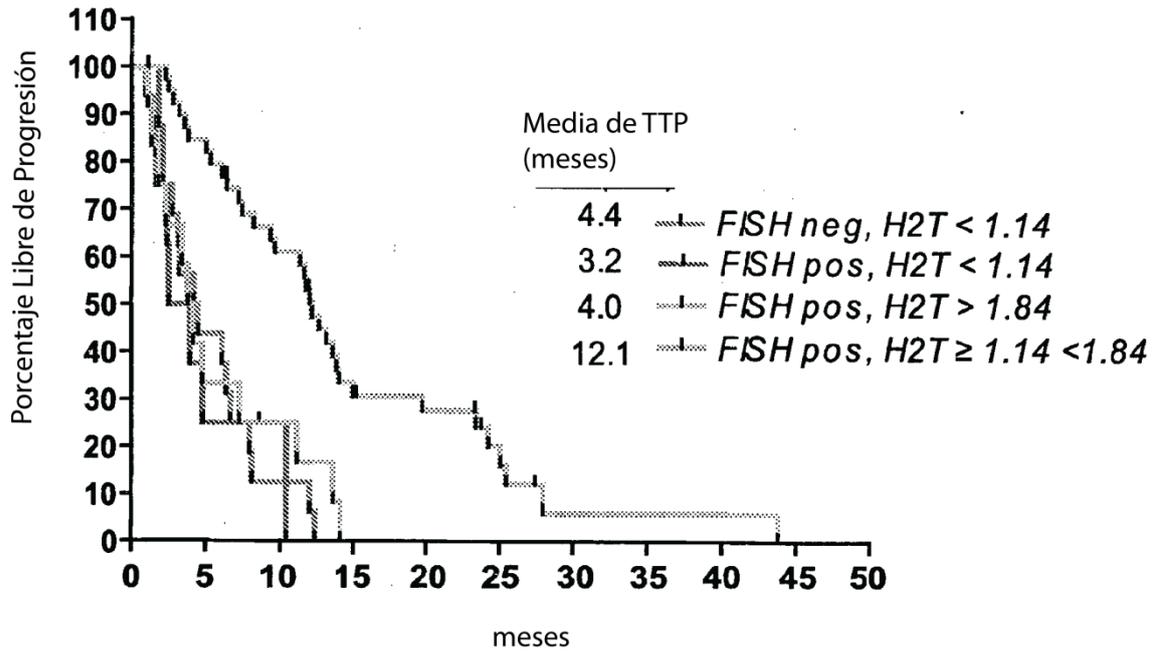


FIGURA 8

Tiempo hasta la progresión

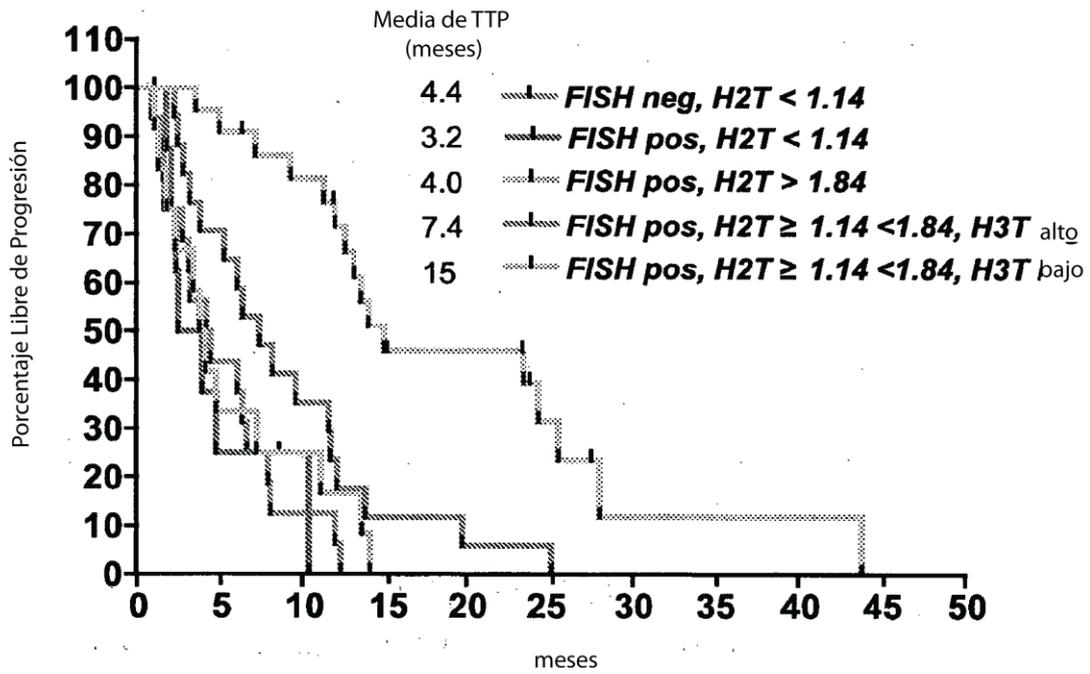


FIGURA 9A

Tiempo hasta la recurrencia a distancia para pacientes HER2 positivos con $\log H2T < 2,1$

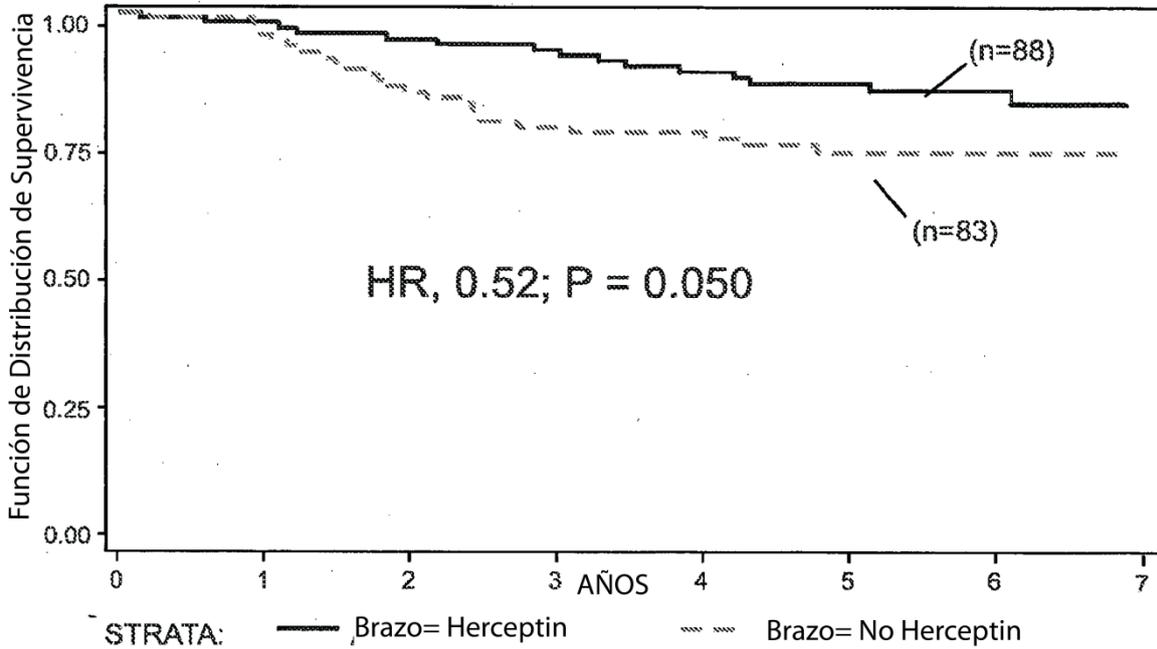


FIGURA 9B

Tiempo hasta la recurrencia a distancia para pacientes HER2 positivos con $\log H2T \geq 2,1$

