

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 723**

51 Int. Cl.:

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 10732183 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2387711**

54 Título: **Métodos de determinación de la respuesta del paciente mediante la medición de Her-3**

30 Prioridad:

15.01.2009 US 145029 P

08.05.2009 US 176630 P

17.06.2009 US 187962 P

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

14.05.2015

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 2 535 723 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 mediante la medición de Her-3

Antecedentes de la invención

5 Por lo general, un biomarcador presenta una característica que se puede medir y evaluar de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patógenos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Véase Atkinson et al, 2001, Clin. Pharmacol. Ther. 69:89-95. Los biomarcadores varían en gran medida por lo que respecta a su naturaleza, facilidad de medición y correlación con estados fisiológicos de interés. Véase, por ejemplo, Frank et al, 2003, Nature Reviews Drug Discovery 2:566-580. En general, se cree que el desarrollo de nuevos biomarcadores validados conducirá tanto a una reducción significativa de los costes de desarrollo de fármacos y sanitarios como a importantes mejoras en el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones. Por ello, se ha dedicado un gran esfuerzo al uso de las nuevas tecnologías para encontrar nuevas clases de biomarcadores. Véase, por ejemplo, Petricoin et al., 2002, Nature Reviews Drug Discovery, 1:683-695; y Sidransky, 2002, Nature Reviews Cancer 2:210-219; Ludwig y Weinstein, 2005, Nature Reviews Cancer 5:845-856; Lee et al, 2007, Adv. Cancer. Res., 96:269-298; Dhani y Siu, 2008, Cancer Metastasis Rev. 27:339-349; Cardenet al., 2009, Clin. Pharmacol. Ther. 85:131- 133.

10 Las interacciones de los componentes de la membrana de la superficie celular desempeñan funciones fundamentales en la transmisión de señales extracelulares a una célula, tanto en la fisiología normal como en estados patológicos. En particular, muchos tipos de receptores de superficie celular se someten a dimerización, oligomerización o agrupación en relación con la transducción de una señal o evento extracelular en una respuesta celular, como, por ejemplo, proliferación, aumento o disminución de la expresión genética o similares. Véase, por ejemplo, George et al, 2002, Nature Reviews Drug Discovery 1:808-820; Mellado et al, 2001, Ann. Rev. Immunol. 19:397-421; Schlessinger, 2000, Cell 103:211-225; y Yarden, 2001, Eur. J. Cancer 37:S3-S8. La función de estos eventos en las enfermedades, como el cáncer, ha sido objeto de una intensa investigación y ha conducido al desarrollo de varios fármacos nuevos y candidatos a fármacos. Véase, por ejemplo, Herbst y Shin, 2002, Cancer 94:1593-1611; Yarden y Sliwkowski, 2001, Nature Reviews Molecular Cell Biology 2:127-137; McCormick, 1999, Trends in Cell Biology 9:53-56 (1999); y Blume-Jensen y Hunter, 2001, Nature 411:355-365.

20 Los niveles de expresión de los receptores de superficie celular, tales como Her-2 en el cáncer de mama, se han utilizado como biomarcadores, especialmente para determinar el pronóstico de un paciente o si un paciente responderá o no a determinados tratamientos. Por otra parte, las tirosina quinasas oncogénicas, como miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, han proporcionado objetivos para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, los inhibidores de la tirosina quinasa dirigidos a EGFR y Her-2 han demostrado una menor eficacia clínica de lo que anticipaban los prometedores estudios preclínicos, lo que ha despertado el interés en otros miembros de la familia de los EGFR, como Her-3, en parte por su valor para el pronóstico como biomarcadores y en parte debido a sus interacciones con otros miembros de la familia, que conduzcan a nuevos objetivos de fármacos potenciales. Véase Menendez y Lupu, 2007, Breast Cancer Research 9:111; Lee-Hoeflich et al, 2008, Cancer Res 68:5878-5887; Fuchs et al, 2006, Anticancer Res. 26:4397-4402; Sergina et al., 2007, Nature 445:437-441; y Tovey et al., 2006, J. Pathol. 210:358-362.

30 En ocasiones el Her-3 presenta unos niveles de expresión excesivos en los pacientes con cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de faringe, cáncer pancreático, cáncer esofágico, glioma, carcinoma del tracto biliar, colangiocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de endometrio, cáncer de vesícula biliar, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células basales. Se han utilizado análisis inmunohistoquímicos (IHC) convencionales o por hibridación fluorescente *in situ* (FISH) para detectar esta sobreexpresión de Her-3. Lamentablemente, los análisis de IHC y FISH presentan ciertas limitaciones como herramientas de diagnóstico, dado que no son necesariamente precisos y se prestan a diferentes interpretaciones por parte de los distintos miembros del personal de laboratorio. En la actualidad no se dispone de ningún método que permita evaluar de forma exacta el nivel de Her-3. La llegada de un método cuantitativo para medir Her-3 facilitaría la capacidad para determinar de forma precisa el pronóstico de un paciente con cáncer o si es probable que el paciente responda a un determinado tratamiento. Véase Mosesson et al., 2004, Semin. Cancer. Biol. 14:262-270. AN Mukherjee, J. Pannu, L. Cao, S. Gangakhedkar, Y. Tan, R. Dua, H. Tahir, A. Chenna, M. Tang y S. Singh, Proc Amer Assoc Cancer Res, Volumen 46, 2005, Abstract #3688, divulga correlaciones entre el estado de activación de ErbB y la respuesta clínica en pacientes con cáncer de mama tratados con Herceptin.

Resumen de la invención

55 La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. En el presente se divulga un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o la cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo en una muestra, de forma que el método consiste en suministrar una muestra y determinar la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un

complejo en la muestra. En determinadas realizaciones, la cantidad de Her-3 se encuentra por encima de un primer umbral, de forma que la muestra es clasificada como una muestra con una cantidad "elevada" de Her-3 (por ejemplo, Her-3 total y/o homodímeros de Her-3 y/o heterodímeros de Her-3). En algunas realizaciones, el valor del primer umbral para Her-3 es un Her-3 total (H3T) de $> 0,158$ y un valor de Her-3 bajo se encuentra por debajo de este umbral. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se va a controlar. Por tanto, cada uno de los valores de los umbrales y/o rangos de los umbrales que se describen en el presente pueden variar en aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas o menos en una escala logarítmica y/o en un 25% o menos en una escala lineal (es decir, ser $<25\%$ mayores y/o $<25\%$ menores que los rangos específicos divulgados en el presente), 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 una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido fresco, una muestra fijada, una muestra congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor de una muestra de tumor fresca o congelada. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama en un estadio temprano (es decir, adyuvante) o un cáncer de mama metastásico.

En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos y/o aspectos divulgados en el presente, el método comprende la detección de otros biomarcadores en la muestra. Por ejemplo, se pueden medir otros biomarcadores tales como Her-2 y/o p95. O bien, estos otros biomarcadores pueden ser uno de los siguientes: FOXM1, PRAME, Bc12, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GAT A3, TFRC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chkl, ID1, EstRI, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG11, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1a, IGFBP3; CTSB, Her3 o DIABLO. En determinadas realizaciones, el otro biomarcador puede ser VEGF, CD31, KDR, p95, o Her-2.

En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos y/o aspectos divulgados en el presente, el nivel de expresión de Her-2 en el cáncer de mama es elevado. En determinadas realizaciones, una expresión de Her-2 elevada es un $\log_{10}H2T \geq$ a aproximadamente 1,14 - 1,25. En determinadas realizaciones, la expresión elevada de Her-2 comprende una expresión que es muy elevada y/o moderadamente elevada. En determinadas realizaciones, la expresión muy elevada de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq$ a aproximadamente 1,84 - 2,21. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados en el presente, la expresión moderadamente elevada se encuentra entre 1,14 - 1,25 y 1,84-2,21 (es decir, $\geq 1,14 - 1,25$ y $\leq 1,84 - 2,21$). También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se va a controlar. Por tanto, cada uno de los valores de los umbrales y/o rangos de los umbrales que se describen en el presente pueden variar en aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas o menos en una escala logarítmica y/o en un 25% o menos en una escala lineal (es decir, ser $\leq 25\%$ mayores y/o $\leq 25\%$ menores que los rangos concretos divulgados en el presente), 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.

Asimismo, en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos y/o aspectos de la invención divulgados en el presente, el nivel de p95 se puede evaluar como alto o bajo. En algunas realizaciones el valor del primer umbral para p95 es un valor de p95 total ≥ 90 (en una escala lineal) y un valor de p95 bajo se encuentra por debajo de este umbral. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se va a controlar. Por tanto, cada uno de los valores de los umbrales y/o rangos de los umbrales que se describen en el presente pueden variar en aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas o menos en una escala logarítmica y/o en un 25% o menos en una escala lineal (es decir, ser $\leq 25\%$ mayores y/o $\leq 25\%$ menores que los rangos concretos divulgados en el presente), 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 el nivel de Her-3 es elevado, es menos probable o poco probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es bajo, es más probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, la terapia es un agente que actúa sobre Her. En determinadas realizaciones, la terapia es al menos un agente que actúa sobre Her-2 o un agente dirigido a Her-3.

Por tanto, en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos y aspectos de la invención divulgados en el presente, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del sujeto una cantidad de Her-2 y/o homodímeros de her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2 es moderadamente elevada y la expresión de Her-3 es baja, entonces es probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o que el paciente tenga una evolución prolongada. En determinadas realizaciones, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del sujeto una cantidad de Her-2 y/o homodímeros de

Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2 es moderadamente elevada y la expresión de Her-3 es alta, entonces es poco probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o que el paciente tenga una evolución breve.

5 Adicional y/o alternativamente, en determinadas realizaciones de cada uno de los métodos y aspectos de la invención divulgados en el presente, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del paciente una cantidad de p95, donde si la cantidad de p95 y la expresión de Her-3 es baja, entonces es probable que el paciente responda al agente de acción terapéutica y/o que el paciente tenga una evolución prolongada. En una realización, el paciente también presenta un nivel elevado (o moderadamente elevado) de Her-2. En determinadas realizaciones, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del
10 sujeto una cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2 es elevada o moderadamente elevada y la expresión de Her-3 y/o la expresión de p95 es elevada, entonces es poco probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o que el paciente tenga una evolución breve.

15 En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio.

20 El método consiste en mezclar la muestra con un compuesto de unión y determinar la presencia y/o cantidad del compuesto de unión unido a Her-3 y/o Her-3 en un complejo. El compuesto de unión se une específicamente a Her-3. El compuesto de unión comprende un anticuerpo. El anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8 que se establecen en el Ejemplo 2 y se muestran en la Figura 2A. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13,14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las
25 secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16,17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19,20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente, o el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente, y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, el método consiste en mezclar i) una muestra que puede contener Her-3 y/o Her-3 en un complejo; ii) una sonda de proximidad que es capaz de unirse a Her-3, donde la sonda de proximidad tiene una proximidad efectiva; y iii) al menos un
30 compuesto de unión, de forma que el compuesto o los compuestos de unión son capaces de unirse a Her-3 y de tener una o más moléculas de señalización unidas, donde la unión de la sonda de proximidad y el compuesto de unión dentro de la proximidad efectiva produce una señal de las etiquetas moleculares que se correlaciona con la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión es capaz de unirse específicamente a Her-3 o al menos a otro analito o analitos. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprenden también un anticuerpo y cada anticuerpo se puede unir a un epitopo específico en Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8 que se recogen en el Ejemplo 2 y se muestran en la Figura 2A. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una
35 región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13,14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende GDR1, GDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen
40 en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente, o el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tienen las SEC. ID. N° 9 y 11 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente, y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra fijada, congelada o un lisado. En una
45 realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio. En una
50 realización preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 2 logaritmos. En una realización más preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 1-1,5 logaritmos en muestras de cáncer de mama.

En una realización preferible, el método proporciona un continuum cuantitativo de la expresión de Her-3. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible como mínimo a entre 1000 receptores por célula y 200 000 receptores por célula aproximadamente, según se ha determinado con estudios de precisión realizados con modelos de líneas de células bien caracterizadas y tecnologías de validación contrastada como ELISA y citometría de flujo. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 5000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 10 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 25 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición es específica, según se ha determinado utilizando anticuerpos de control del isotipo y comparaciones con métodos convencionales de IHC.

En una realización preferible, la sonda de proximidad comprende un anticuerpo y un primer ácido nucleico y el compuesto de unión comprende un anticuerpo y un segundo ácido nucleico, donde el primer y el segundo ácido nucleico son complementarios entre sí y capaces de hibridarse para determinar la proximidad efectiva y producir la señal, directa o indirectamente, a través de la hibridación. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión son capaces de unirse específicamente a Her-3. En una realización preferible, el compuesto de unión y/o la sonda de proximidad comprenden también un anticuerpo y cada anticuerpo se une a un epítipo diferente en Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 6-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente; o el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra fijada, congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio. En una realización preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 2 logaritmos. En una realización más preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 1-1,5 logaritmos en muestras de cáncer de mama. En una realización preferible, el método proporciona un continuum cuantitativo de la expresión de Her-3. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible como mínimo a entre 1000 receptores por célula y 200 000 receptores por célula aproximadamente, según se ha determinado con estudios de precisión realizados con modelos de líneas de células bien caracterizadas y tecnologías de validación contrastada como ELISA y la citometría de flujo. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 5000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 10 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 25 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición es específica, según se ha determinado utilizando anticuerpos de control del isotipo y comparaciones con métodos convencionales de IHC.

En una realización preferible, la sonda de proximidad comprende una sonda de clivaje que tiene una fracción que induce el clivaje y el compuesto de unión o los compuestos de unión tienen una o más etiquetas moleculares unidas al compuesto de unión mediante un enlace clivable, donde el enlace clivable se puede clivar dentro de la proximidad efectiva, lo que produce una señal que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de Her-3. En una realización preferible, la sonda de clivaje y/o el compuesto de unión son capaces de unirse específicamente a Her-3. En una realización preferible, el compuesto de unión y/o la sonda de proximidad comprenden también un anticuerpo y cada anticuerpo se une a un epítipo diferente en Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 6-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena

5 ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. Nº 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. Nº 22, 23 y 24, respectivamente; o el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. Nº 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. Nº 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción Detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra fijada, congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio. En una realización preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 2 logaritmos. En una realización más preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 1-1,5 logaritmos en muestras de cáncer de mama. En una realización preferible, el método proporciona un continuum cuantitativo de la expresión de Her-3. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible como mínimo a entre 1000 receptores por célula y 200 000 receptores por célula aproximadamente, según se ha determinado con estudios de precisión realizados con modelos de líneas de células bien caracterizadas y tecnologías de validación contrastada como ELISA y citometría de flujo. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 5000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 10 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 25 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición es específica, según se ha determinado utilizando anticuerpos de control del isotipo y comparaciones con métodos convencionales de IHC.

En un segundo aspecto, se divulga un método para determinar si un sujeto que padece cáncer es probable que responda al tratamiento con una terapia seleccionada, para predecir la evolución temporal de la enfermedad y/o predecir la probabilidad de que se produzca un evento significativo durante la evolución del cáncer del sujeto, que consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del sujeto una cantidad de Her-3, donde el método depende del nivel de Her-3. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es elevado, es menos probable o poco probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es bajo, es más probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, tal y como se describe más detalladamente en el presente, la terapia es un agente que actúa sobre Her. En otras realizaciones, la terapia es al menos un agente que actúa sobre Her-2 o bien un agente dirigido hacia Her-3. En determinadas realizaciones, la cantidad de Her-3 se encuentra por encima de un primer umbral, de forma que la muestra es clasificada como una muestra con una cantidad "elevada" de Her-3 (por ejemplo, Her-3 total y/o homodímeros de Her-3 y/o heterodímeros de Her-3). En algunas realizaciones, el valor del primer umbral para Her-3 es un total de Her-3 (H3T) $\geq 0,158$ y un valor de Her-3 bajo se sitúa por debajo de este umbral. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se va a controlar. Por tanto, cada uno de los valores de los umbrales y/o rangos de los umbrales que se describen en el presente pueden variar en aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas o menos en una escala logarítmica y/o en un 25% o menos en una escala lineal (es decir, ser $\leq 25\%$ mayores y/o $\leq 25\%$ menores que los rangos concretos divulgados en el presente), 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 una realización preferible, el cáncer del sujeto es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de faringe, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, glioma, carcinoma del tracto biliar, colangiocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de endometrio, cáncer de la vesícula biliar, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células basales. En una realización preferible, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama, melanoma, carcinoma sinovial, cáncer colorrectal o cáncer de ovario. En una realización preferible, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama positivo en Her-2. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama en un estadio temprano (es decir, adyuvante) o un cáncer de mama metastásico.

Como se ha señalado anteriormente, en determinadas realizaciones el método comprende la detección de otros biomarcadores en la muestra. Por ejemplo, se pueden medir otros biomarcadores tales como Her-2 y/o p95. O bien, estos otros biomarcadores pueden ser al menos uno de los siguientes: FOXM1, PRAME, Bc12, STK15, CEGP1, Ki-67, GSTM1, CA9, PR, BBC3, NME1, SURV, GAT A3, TFRC, YB-1, DPYD, GSTM3, RPS6KB1, Src, Chkl, ID1, EstRI, p27, CCNB1, XIAP, Chk2, CDC25B, IGF1R, AK055699, P13KC2A, TGFB3, BAG1, CYP3A4, EpCAM, VEGFC, pS2, hENT1, WISP1, HNF3A, NFKBp65, BRCA2, EGFR, TK1, VDR, Contig51037, pENT1, EPHX1, IF1A, CDH1, HIF1a, IGFBP3; CTSB, Her3 o DIABLO. En determinadas realizaciones, el otro biomarcador puede ser VEGF, CD31, KDR, p95, o Her-2.

- En determinadas realizaciones, el nivel de expresión de Her-2 en el cáncer de mama es elevado. En determinadas realizaciones, una expresión de Her-2 elevada es un $\log_{10} \text{OH2T} \geq 1,14-1,25$ aproximadamente. En determinadas realizaciones, la expresión elevada de Her-2 comprende una expresión que es muy elevada y/o moderadamente elevada. En determinadas realizaciones, la expresión muy elevada de Her 2 es un $\log_{10} \text{OH2T} \geq 1,84 -2,21$ aproximadamente. En determinadas realizaciones de cada uno de los métodos divulgados en el presente, la expresión moderadamente elevada se encuentra entre $1,14-1,25$ y $1,84-2,21$ (es decir, $\geq 1,14 - 1,25$ y $\leq 1,84 - 2,21$). También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se va a controlar. Por tanto, cada uno de los valores de los umbrales y/o rangos de los umbrales que se describen en el presente pueden variar en aproximadamente 0,5 unidades logarítmicas o menos en una escala logarítmica y/o en un 25% o menos en una escala lineal (es decir, ser $\leq 25\%$ mayores y/o $\leq 25\%$ menores que los rangos concretos divulgados en el presente), 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.
- Por otra parte, en determinadas realizaciones el nivel de p95 también se puede valorar como alto o bajo. En algunas realizaciones el valor del primer umbral para p95 es un valor total de p95 \geq o ≥ 90 (en una escala lineal) y un valor de p95 bajo se sitúa por debajo de este umbral. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente y/o del evento significativo que se va a controlar. Por tanto, cada uno de los valores de los umbrales y/o rangos de los umbrales que se describen en el presente pueden variar en aproximadamente un 25% o menos (es decir, ser $\leq 25\%$ mayores y/o $\leq 25\%$ menores que los rangos concretos divulgados en el presente), 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 el nivel de Her-3 es elevado, es menos probable o poco probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es bajo, es más probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, la terapia es un agente que actúa sobre Her. En determinadas realizaciones, la terapia es al menos un agente que actúa sobre Her-2 o un agente dirigido a Her-3.
- Por tanto, en determinadas realizaciones, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del sujeto una cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2 es moderadamente elevada y la expresión de Her-3 es baja, entonces es probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o que el paciente tenga una evolución prolongada. En determinadas realizaciones, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del sujeto una cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2 es moderadamente elevada y la expresión de Her-3 es alta, entonces es poco probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o que el paciente tenga una evolución breve.
- Adicional y/o alternativamente, en determinadas realizaciones el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del paciente una cantidad de p95, donde si la cantidad de p95 y la expresión de Her-3 es baja, entonces es probable que el paciente responda al agente de acción terapéutica y/o que el paciente tenga una evolución prolongada. En una realización, el paciente también presenta un nivel elevado (o moderadamente elevado) de Her-2. En determinadas realizaciones, el método consiste en medir en una muestra biológica del cáncer del sujeto una cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2, donde si la cantidad de Her-2 y/o homodímeros de Her-2 es elevada o moderadamente elevada y la expresión de Her-3 y/o la expresión de p95 es elevada, entonces es poco probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o que el paciente tenga una evolución breve.
- En una realización preferible, la terapia seleccionada es al menos un agente dirigido a la familia Her. En una realización preferible, el agente dirigido a la familia Her es un agente dirigido a múltiples objetivos o a un único objetivo. En una realización preferible, el agente dirigido a múltiples objetivos es un inhibidor de quinasas dual o un anticuerpo biespecífico. En una realización preferible, el agente dirigido a la familia Her es trastuzumab, lapatinib o pertuzumab. En una realización preferible, el al menos un agente dirigido a la familia Her es al menos dos agentes, donde los al menos dos agentes son uno o más anticuerpos monoclonales dirigidos a Her-2 y/o anticuerpos monoclonales dirigidos a EGFR y/o un inhibidor de quinasas dual de Her-2 y EGFR. En una realización preferible, el anticuerpo monoclonal es trastuzumab. En una realización preferible, el anticuerpo monoclonal dirigido a EGFR es cetuximab o panitumumab. En una realización preferible, el inhibidor de quinasas dual es lapatinib, erlotinib o gefitinib. En una realización preferible, la terapia seleccionada es un agente que actúa sobre Her-3 o sobre la vía de señalización de Her-3. En una realización preferible, el agente dirigido a Her-3 o la vía de señalización de Her-3 es un anticuerpo monoclonal de Her-3, un inhibidor de la dimerización de Her-3, un inhibidor de la fosforilación de Her-3 y/o un inhibidor de un miembro de la vía de señalización de Her-3 seleccionado del grupo compuesto por PI3K, Akt, mTOR y ERK1/2. En una realización preferible, la probabilidad de responder, la probabilidad de tener una evolución prolongada y/o la probabilidad de tener un evento significativo se mide como una tasa de supervivencia total, como el tiempo hasta la progresión, como la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia libre de progresión y/o como una respuesta objetiva del tumor utilizando los criterios RECIST.

En una realización preferible, donde el cáncer es Her-2 positivo se determina mediante IHC, FISH, CISH, ARNm cuantitativo, una matriz de hibridación o VERATAG®. En una realización preferible, la determinación del nivel de Her-3 se realiza utilizando IHC, FISH, GISH, ARNm cuantitativo, una matriz de hibridación o VERATAG®.

5 En una realización preferible, el método comprende también la determinación de que un sujeto está afectado por un cáncer Her-2 positivo que es poco probable que responda al tratamiento, de conformidad con el método de la invención, y por tanto recomienda a un profesional médico la opción de tratamiento de administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente terapéutico diferente.

10 En un tercer aspecto, se divulga un anticuerpo purificado que se une a Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente. En una realización preferible, el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1 (véase la Descripción detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1 (véase la Descripción Detallada) para las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Breve descripción de los dibujos

25 La Figura 1 muestra los niveles de expresión de Her-3 determinados con un kit Her-3 ELISA (R&D Systems, Inc.) en varios clones sometidos a transfección estable de HEK 293 (células de riñón embrionario humano) transfectados con un vector de expresión de HER3. La construcción del vector de expresión se describe en el Ejemplo 1. Un clon, 293H3-Clon 1, expresó unos niveles elevados de HER3 y fue seleccionado como control para su uso en el ensayo optimizado de HER3 con VERATAG®.

30 La Figura 2A contiene una lista de las secuencias peptídicas utilizadas para inmunizar a los ratones con el objeto de elevar los niveles de anticuerpos específicos para Her-3, donde la SEC. ID. N° 1 es LGSALSLPVLNRPRGTGQSLLSP; la SEC. ID. N° 2 es SAYHSQRHSLLTPTPLSP; la SEC. ID. N° 3 es VGSDLSASLGSTQSCPLHPVPI; la SEC. ID. N° 4 es CQGGPHQAPHVHYARLKLTLRS; la SEC. ID. N° 5 es LEEVELEPELDDLLEAE; la SEC. ID. N° 6 es CFDPNPYWH SRLFPKANA; la SEC. ID. N° 7 es CPDYWH SRLFPKANAQRT; y la SEC. ID. N° 8 es CFPKANAQRT. Las secuencias peptídicas representan diferentes epitopos de la región C-terminal de Her-3 (se muestra la longitud de cada péptido y la posición con respecto al extremo N-terminal de la proteína). Los anticuerpos que actúan contra cada péptido se recogen en la cuarta columna. Se ha confirmado un resultado positivo de cada uno de los anticuerpos en los ensayos ELISA, IHC, y VERATAG®. La Figura 2B muestra los resultados de los estudios de IHC en los que se analizan dos líneas de células con B9A11, un anticuerpo específico para Her-3 que actúa contra uno de los péptidos de Her-3, un anticuerpo específico para Her-2 (HerceptTest™) y un anticuerpo de control ITC-IgG2a. Se sabe que una línea de células, SKOV3 (recuadros superiores) expresa unos niveles elevados de HER2 y unos niveles bajos de HER3. La otra línea de células, 293H3-clon1 (recuadros inferiores), es la línea de células sometida a transfección estable que se describe en el Ejemplo 1 y se muestra en la Figura 1 para que presente una sobreexpresión de HER3, aunque expresa bajos niveles de HER2. Los resultados de la IHC muestran una fuerte señal de B9A11 con las células del 293H3-clon 1, pero no con las células de SKOV3, tal y como se expresaba.

45 La Figura 3 muestra los niveles de HER3 determinados mediante VERATAG® en bloques FFPE de cuatro líneas de células diferentes, sometidos a validación cruzada con los datos de otros tres ensayos (IHC, ELISA, y citometría de flujo). Las líneas de células que expresaban diversos niveles de HER3 se seleccionaron para estos estudios: 293H3-Clon 1, MDA-MB-453, MDAMB-468 y SKOV3 (las tres últimas de ATCC). Las líneas de células se seleccionaron para representar unos niveles del receptor HER-3 superiores a 2 logaritmos. Los bloques de FFPE se prepararon tal y como se describe en el Ejemplo 3 para someterlos a ensayo de HER3 con VERATAG® e IHC. Una parte de las células del mismo lote se sometió a ensayo para detectar la cantidad de receptor HER3 utilizando citometría de flujo. Además, el conjunto del lisado de células se preparó con el mismo lote de células para cuantificar el HER3 con un kit ELISA (Human ErbB3-DuoSet ELISA: R&D Systems, Inc.). Los datos muestran un amplio rango dinámico para el ensayo con VERATAG®, con resultados uniformes con las otras tres metodologías.

60 La Figura 4 muestra ejemplos de muestras de tumor de pacientes en las que un patólogo certificado por el Consejo ha rodeado con un círculo la zona del tumor.

La Figura 5 muestra el equipo utilizado y el flujo de trabajo del ensayo de HER3 con VERATAG®. Las muestras FFPE se desparafinan primero y se rehidratan empleando una serie de solventes (recuadro superior 1). La recuperación de antígeno se realiza utilizando IxDAKO (Lab Vision) en una olla a presión (recuadro superior 2). A continuación, se enjuagan las muestras con agua y se utiliza un bolígrafo hidrófobo para dibujar un círculo alrededor de la muestra, reteniendo los reactivos sobre el portaobjetos. Después se bloquean las muestras y se tratan con una mezcla de Ab-6 (Lab Vision) conjugado con VERATAG® y B9A11 conjugado con biotina (recuadro superior 3). Después de la incubación y el lavado, se añade un reactivo de azul de metileno conjugado con estreptavidina, se procede a la incubación y el lavado, y se añade una solución tampón de iluminación que contiene fluoresceína y dos marcadores internos de electroforesis capilar (MF y ML, marcador primero y último, respectivamente). El VERATAG® unido se libera utilizando una matriz de LED, que fotoactiva el clivaje de VERATAG® (recuadro superior 4). Los productos intermedios de VERATAG® se reducen a una forma cuantificable utilizando borohidruro de sodio y los indicadores de VERATAG® se separan y detectan utilizando electroforesis capilar (instrumento ABB 130 CE, recuadro superior 5).

La Figura 6 muestra los resultados de un experimento diseñado para identificar la concentración de anticuerpos óptima para maximizar el rango dinámico del ensayo VERATAG®. Se seleccionaron las líneas de células que abarcan todo el rango dinámico del ensayo: 293H3-Clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y SKOV3. La concentración de los anticuerpos B9A11-biotina y Ab-6 Pro-11 se modificó (columna 1 de la tabla) como sigue: 1 mg/ml de B9A11-biotina y 1 mg/ml de Ab-6 Pro-11, 1 mg/ml de B9A11-biotina y 2 mg/ml de Ab-6 Pro-11 y 2 mg/ml de B9A11-biotina y 1 mg/ml de Ab-6 Pro-11, en las filas 4, 5 y 6, respectivamente. Los resultados para cada línea de células se muestran en el gráfico de barras. Los niveles de cambios previstos para las comparaciones por pares se basaron en la citometría de flujo de HER3 y en los resultados de ELISA de la preparación del bloque FFPE de la misma línea de células. Se eligió una concentración óptima de 2 mg/ml de B9A11-biotina y 1 mg/ml de Ab-6 Pro-11 (rodeada con un círculo) para obtener el mejor rendimiento basándose en la detección exacta de Her3 en comparación con los niveles de cambios previstos que se muestran en la fila 2 de la tabla. El rango dinámico mostrado aquí es aproximadamente de 2 logaritmos.

La figura 7 muestra la exactitud del ensayo de HER3 VERATAG® utilizando tres replicados competentes de cuatro líneas de células bien caracterizadas (293H3-Clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468 y SKOV3). Las mediciones de VERATAG® se compararon con los datos de ELISA y de citometría de flujo generados internamente. El 100% de los resultados coincidían con los datos internos de la citometría de flujo y el ensayo ELISA en el sentido de que 293H3-clon 1 > MDA-MB-453 > MDA-MB-468 > SKOV3. No se observó ningún solapamiento entre los niveles de señal de ninguna de las cuatro muestras de líneas de células.

La Figura 8 demuestra la sensibilidad del ensayo de HER3 VERATAG®. Un lote que contenía 8 replicados de la línea de células de control con expresión de HER3 baja, MDA-MB-468, se comparó con 8 replicados de la línea de células de control con expresión de HER3 baja/negativa, SKOV3, para determinar la sensibilidad. Todas las comparaciones por pares (64/64) entre MDA-MB-468 y SKOV3 demostraron que MDA-MB-468 presentaba unos niveles más elevados de HER3 que SKOV3.

La Figura 9 muestra la reproducibilidad interensayo del ensayo de HER3 VERATAG®. Se realizaron ocho ensayos separados de HER3 VERATAG® en total en las cuatro líneas de células bien caracterizadas, 293H3-Clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468 y SKOV3, utilizando diferentes iluminadores de CE, varios operadores y en diferentes días durante un periodo de cuatro semanas. Tras los procedimientos de normalización de los lotes, se compararon los datos de los ocho lotes para averiguar la reproducibilidad. El coeficiente de variabilidad en todo el rango dinámico se situó entre el 8 y el 15%. Los valores están representados como $\text{Log}_{10}\text{normRPA}$, que es el logaritmo del área del pico relativo normalizado/área del tumor y, a continuación, lote normalizado utilizando los valores previstos.

La Figura 10 muestra la precisión del ensayo de HER3 VERATAG®. La reproducibilidad intraensayo del ensayo de HER3 VERATAG® se demostró comparando el rendimiento de 15 replicados de cada una de las tres líneas de células de control, 293H3-Clon 1, MDA-MB-453 y MDA-MB-468. Se realizaron comparaciones por pares de los 15 replicados de cada lote para determinar la precisión. El 95% de los datos de 293H3-Clon 1 se encontraban dentro de un nivel de cambio de 1,2 y el 95% de los datos de MDA-MB-468 dentro de un nivel de cambio de 1,37. Los datos de VERATAG® (mostrados en el RPA normalizado) para los 15 replicados de cada línea de células se muestran en las 15 barras de la derecha de cada recuadro. Los datos de control de las tres líneas de células que expresan unos niveles de moderados a altos de HER3 y una línea de células que expresa HER3 bajo/negativo, SKOV3, se muestran a la izquierda de cada recuadro.

La Figura 11 muestra la linealidad del ensayo de HER3 VERATAG® utilizando diferentes tamaños de muestras. Se ensayaron muestras de tamaño descendente (1x, 1/2x, 1/4x, 1/16x) de cada una de las tres líneas de células bien caracterizadas, 293H3-Clon 1, MDA-MB-453 y MDA-MB-468, en el ensayo VERATAG® y se compararon los datos por pares para evaluar la linealidad del ensayo. La línea de células MDA-MB-453 demuestra linealidad hasta aproximadamente 1/16 del tamaño de muestra original; MDA-MB-468 demuestra linealidad hasta aproximadamente 1/2* del tamaño de muestra original.

La Figura 12 muestra la especificidad del ensayo de HER3 VERATAG® determinada mediante controles del isotipo. Los anticuerpos de control del isotipo se ensayaron en el formato del ensayo VERATAG® para

5 averiguar los antecedentes no específicos del ensayo. Para el anticuerpo Ab-6-Prol 1 de HER3, el control del isotipo fue IgGI-Pro 11. Para el anticuerpo HER3 B9A11 -biotina de HER3, el control del isotipo fue IgGI-biotina. La señal obtenida utilizando estos controles del isotipo no es específica de antígeno y, por tanto, representa antecedentes no específicos. En cada grupo, los resultados de VERATAG® se muestran para el formato de ensayo normal utilizando los anticuerpos Ab6- Prol 1 y B9A11-biotina de HER3 en las barras marcadas como "control". En el recuadro izquierdo, los datos de VERATAG® se muestran para los anticuerpos Ab6-Prol 1 e IgGI-biotina de HER3 en las barras marcadas como "IgG-bio". En el recuadro derecho, los datos de VERATAG® se muestran para los anticuerpos B9A11-biotina e IgGI-Prol 1 de HER3 en las barras marcadas como "IgG-Prol 1". Cada pareja de anticuerpos se ensayó en un conjunto de muestras FFPE incluyendo 10 controles estándar de líneas de células (293H3-Clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB468, SKOV3 y T47D), así como varias muestras de tumores (41776B1, 32712A2, 30345C2, 106305A2 y 106341A2). Las unidades son RPA*IB/TA normalizadas.

15 La Figura 13 muestra los datos de VERATAG® para muestras de tumores del ensayo de International Serum Her-2/neu Study Group. Esta cohorte de pacientes (n=105) se observó prospectivamente durante el tratamiento con trastuzumab entre 1999 y 2006. Se determinó que todos los pacientes eran Her-2 positivo mediante IHC o FISH y que no habían estado expuestos a trastuzumab antes del estudio. Las muestras se evaluaron para determinar los niveles de HER3 utilizando el ensayo de HER3 VERATAG® en ocho lotes separados. Los resultados se muestran en los ocho recuadros de esta figura. Cada recuadro incluye también los resultados de cinco líneas de células de control: 293H3-Clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468, SKOV3 y T47D (mostradas a la izquierda de cada recuadro). Los resultados se muestran en unidades de Log10 RPA normalizadas.

20 La Figura 14 muestra los datos de análisis de detección utilizados para determinar el valor de corte óptimo para la respuesta a trastuzumab (es decir, herceptin). En el recuadro de la izquierda, los pacientes que superan un corte estadísticamente significativo (véase la flecha) presentaban un tiempo hasta la progresión (TTP) desfavorable en comparación con los pacientes que se situaban por debajo del valor de corte (cociente de riesgo = 2,3; p = 0,0004). En el recuadro de la derecha, no se pudo determinar un corte significativo, pero utilizando el corte averiguado para el TTP, se observó una tendencia de empeoramiento de la supervivencia total (OS) en pacientes que superaban el valor de corte (indicado por la flecha) (cociente de riesgo = 1,7; p = 0,059).

25 La Figura 15 muestra el método de Kaplan-Meier para una cohorte de 82 pacientes tratados con trastuzumab estratificados primero por los niveles de HER2 totales (H2T) y, a continuación, estratificados también por los niveles de HER3 totales (H3T). En el recuadro superior izquierdo, el método de Kaplan-Meier muestra el porcentaje de pacientes con supervivencia libre de progresión (meses) para dos grupos de pacientes subdivididos (basados en un corte anteriormente señalado) en grupos de expresión de HER2 normal y sobreexpresión de HER2. El grupo de sobreexpresión de HER2 se subdividió posteriormente de nuevo, utilizando el valor de corte que se muestra en la Figura 14, en dos subgrupos en función del nivel de HER3. El método Kaplan-Meier de estos dos subgrupos se muestra en el recuadro superior derecho. El recuadro inferior muestra tres conjuntos de resultados de los recuadros superiores: el grupo de HER2 normal ($\log(H2T) < 1,14$); el grupo de HER2 alto, HER3 bajo ($\log(H2T) > 1,14$, $H3T < 0,158$) y el grupo de HER2 alto, HER3 alto ($\log(H2T) > 1,14$, $H3T > 0,158$). Los análisis univariados de riesgos proporcionales de Cox con los que se examinó al subgrupo que presentaba una sobreexpresión de HER3 identificaron el nivel de H3T (alto frente a bajo) como el factor de predicción más importante del tiempo hasta la progresión (TTP; HR = 2,98, p = 0,0004).

30 La Figura 16 muestra los resultados de los ensayos de HER3 VERATAG® en el carcinoma sinovial, el cáncer de colon y el cáncer de ovario. El recuadro superior muestra los resultados de un grupo de muestras de carcinoma sinovial. Las cuatro barras de la izquierda son las muestras de control (293H3-Clon 13, MDA-MB-453, MDAMB-468 y SKOV3, de izquierda a derecha, respectivamente). El recuadro del medio muestra los resultados para un grupo de muestras de cáncer de colon. Se utilizan las mismas líneas de células de control (mostradas en las cuatro barras de la izquierda). El recuadro inferior muestra resultados que comparan la expresión de HER2 con la expresión de HER3 en un grupo de muestras de tumor de ovario. Los resultados se muestran en unidades de RPA normalizadas. El rango dinámico de estas muestras de tumor oscila entre 0,5-1,5 dependiendo del cáncer.

35 La Figura 17 muestra que con el grupo de HER2 (H2T) alto ($\log_{10}H2T > 1,25$, o $> 13,8$ en la escala lineal), la capacidad para subdividir a los pacientes en diferentes grupos basándose en unos niveles de p95 altos bajos ($p95 > 90$ o ≤ 90) y de HER3 (H3T) altos o bajos permite una mayor estratificación de los resultados clínicos medidos por la mediana del TTP. El análisis univariado de KM con los subgrupos de p95 y H3T combinados da los resultados que se muestran en los métodos de KM de esta Figura. Estos datos sugieren que las pacientes con cáncer de mama HER2 positivo, determinado mediante HERmark/VERATAG® (es decir, H2T alto, por ejemplo $\log_{10}H2T > 1,25$, o $> 13,8$ en la escala lineal), se pueden clasificar al menos en cuatro subgrupos con resultados diferentes tras el tratamiento con trastuzumab. En el KM, el grupo con H3T bajo (en la generación 1 del ensayo de HER3, $H3T < 0,158$) y p95 bajo ($p95 < 90$) presenta una media de TTP de 15,0 meses, en comparación con los 9,3 meses del grupo con H3T bajo ($H3T < 0,158$) y p95 alto ($p95 > 90$); frente a los 6,4 meses del grupo de H3T alto ($H3T > 0,158$ en la generación 1 del ensayo de HER3) y p95 bajo, y a los 3,2

meses del grupo con H3T alto (H3T>0,158) y p95 alto (p95>90). La tendencia de las diferencias entre los grupos es significativa (p=0,0001).

La Figura 18 muestra análisis de Kaplan-Meier (KM) que compara el porcentaje libre de progresión en el eje Y con respecto al tiempo en el eje X (tiempo hasta la progresión, TTP) de diversos subgrupos de la cohorte de Lipton, definida por las mediciones combinadas de VERATAG® del HER2 total (H2T alto o bajo), p95HER2 (p95 alto o bajo), y HER3 Total (H3T) alto (H3T>0,158, en la generación 1 del ensayo de H3T) o H3T bajo (H3T<=0,158 en la generación 1 del ensayo). Los valores de corte se identificaron por el valor p más bajo en un análisis de detección posicional. H2T alto = (log10H2T > 1,25 o en una escala lineal, >13,8). H2T bajo = log10H2T<= 1,25 o en una escala lineal <=13,8. p95 bajo = p95<=90 y p95 alto = p95>90 (en una escala lineal), y H3T alto >0,158 en una escala lineal, y H3T bajo <=0,158 en una escala lineal). Los análisis de KM demostraron que los pacientes con una FISH positiva, H2T alto, p95 bajo y H3T bajo presentaban una mediana de TTP de 14,7 meses, en comparación con los otros cuatro grupos que no obtenían resultados tan positivos. Tres grupos con líneas prácticamente superpuestas (es decir, el grupo FISH negativa/H2T bajo - mediana TTP = 4,5, el grupo FISH positiva/H2T bajo-mediana TTP = 3,7, y el grupo FISH positiva/H2T alto/p95 alto/H3T alto - mediana TTP = 3,2) tenían una mediana de TTP inferior que el grupo de FISH positiva/H2T alto/p95 bajo/H3T bajo - mediana TTP = 15). El grupo definido como FISH positiva/H2T alto/y p95 o H3T alto tenían una mediana de TTP = 9,3, que se situaba entre el grupo con la mejor mediana de (FISH positiva/H2T alto/p95 bajo/H3T bajo) y los tres grupos de rojo/azul y negro. Por tanto, el ensayo HERmark identificó múltiples subgrupos de pacientes HER2 positivos con diversos resultados clínicos medidos por la TTP que seguían una terapia a base de trastuzumab. Ni la magnitud de la sobreexpresión de HER2 ni el resultado para estos subgrupos resultaba predecible por FISH/CEP número de copia 17. Los pacientes MBC con HER2 FISH positiva que presentan un p95 alto y/o H3T alto pueden representar subconjuntos de pacientes con una resistencia *de novo* a trastuzumab. A pesar de que los solicitantes no desean limitarse a ninguna teoría mecánica concreta, entre los posibles mecanismos que pueden ser la causa de la mala respuesta al trastuzumab observada en estos tres subgrupos se pueden incluir un nivel insuficiente y/o inexistente de una diana de unión a trastuzumab (es decir, p95) y un aumento de la señalización mediante la formación de heterodímeros que no son completamente suprimidos por el trastuzumab.

Descripción detallada de la invención

A efecto del presente, los términos "realización" y "aspecto" se utilizan de forma intercambiable.

"Anticuerpo" significa una inmunoglobulina que se une a una organización polar y espacial concreta de otra molécula y, por tanto, se define como complementaria a la misma. El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante y se puede preparar mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica, tales como la inmunización de un huésped y la recogida de suero (policlonal) o preparando líneas celulares híbridas continuas y recogiendo la proteína secretada (monoclonal) o clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de las mismas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, incluyendo estas inmunoglobulinas las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Los anticuerpos pueden ser también anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o cualquier otro derivado de anticuerpos conocido por un experto en la técnica que conserve una actividad de unión específica para un sitio de unión concreto. Por otra parte, los agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos se pueden utilizar, cuando resulte apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión para un sitio de unión concreto. Las directrices para la producción y selección de anticuerpos y derivados de anticuerpos que se emplean en inmunoensayos, incluyendo los ensayos que emplean la etiqueta molecular liberable (como se describe más adelante) se pueden encontrar en textos y manuales de fácil acceso, por ejemplo Harlow y Lane, 1998. *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; Howard y Bethell, 2001, *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*, CRC Press; Wild, ed., 1994, *The Immunoassay Handbook*, Stockton Press, New York.

"Compuesto de unión" se referirá a una molécula capaz de unirse a otra molécula de interés. Un compuesto de unión puede ser un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de un oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse específicamente a una molécula o complejo diana. En una realización la molécula diana es una proteína o un complejo de proteínas. En otra realización, el compuesto de unión comprende además una sonda de proximidad. En una realización, un compuesto de unión comprende una o más etiquetas moleculares unidas a una fracción de unión. En otra realización, se puede unir un segundo compuesto de unión al compuesto de unión y medirse o cuantificarse como correlativo con la presencia del compuesto de unión, que está unido a la proteína diana. En otro ejemplo específico, el primer o el segundo compuesto de unión puede generar una molécula efectora que actúa conjuntamente con una sonda de proximidad con una proximidad efectiva, produciendo una señal que está correlacionada con la presencia de la proteína diana. Asimismo, en otra realización, los compuestos de unión pueden tener etiquetas moleculares que interactúan entre sí dentro de una proximidad efectiva para formar un complejo que genera una señal o que se puede detectar o medir de manera que se correlaciona con la

presencia de la proteína diana. Más concretamente, la proteína o el complejo diana puede ser Her-3 o Her-3 en un complejo

- 5 "Fracción de unión" significa cualquier molécula a la que las etiquetas moleculares se pueden unir directa o indirectamente y que es capaz de unirse a un analito. Las fracciones de unión incluyen, a título meramente enunciativo, anticuerpos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas orgánicas que tienen un peso molecular de hasta unos 1000 daltons y que se componen de átomos seleccionados del grupo compuesto por hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Preferiblemente, las fracciones de unión son anticuerpos.
- 10 "Líneas de células" se refiere a células que han sido separadas de su tejido original, multiplicadas por clonación y/o mantenidas en cultivo. Como ejemplos específicos, se pueden obtener líneas de células de cada tipo de cáncer y se pueden obtener múltiples líneas de células diferentes de las muestras del mismo tipo de cáncer. Entre los diferentes tipos de líneas de células se incluyen, a título meramente enunciativo, las líneas de células del cáncer de mama, tales como MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-468, o T-47D, o las líneas de células obtenidas de otros tejidos, tales como SKOV3 o HEK293.
- 15 "Agente quimioterapéutico" significa una sustancia química que se utiliza para tratar una enfermedad, particularmente el cáncer.
- Un "enlace clivable", a efectos del presente, se refiere a un grupo de enlaces químicos que pueden ser clivados para liberar una etiqueta molecular detectable conectada a una fracción de unión con el enlace clivable.
- 20 A efectos del presente, una "fracción inductora del clivaje" o un "agente de clivaje", es un grupo que produce una especie activa capaz de clivar un enlace clivable. Preferiblemente, la especie activa es una especie química que presenta una actividad efímera, de forma que sus efectos inductores del clivaje se producen solo en las proximidades del lugar donde se generó.
- 25 A efectos del presente, una "sonda de clivaje" se refiere a un reactivo que comprende una fracción inductora del clivaje, tal y como se define en el presente, y un compuesto de unión como un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, como estreptavidina, una molécula pequeña, como biotina, un oligonucleótido, un análogo de un oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse a una molécula o proteína diana o a un complejo molecular estable.
- 30 "Inhibidor de quinasas dual" se refiere a moléculas que inhiben más de una quinasa, por ejemplo, a título meramente enunciativo, un inhibidor de la actividad tanto de EGFR como de Her-2, como el lapatinib.
- "Proximidad efectiva", a efectos del presente, describe la distancia entre dos compuestos de unión que es suficiente para generar una señal detectable que indica la presencia de la molécula diana. Por ejemplo, una sonda de proximidad y un compuesto de unión que están unidos en Her-3 (o con otro analito de interés) dentro
- 35 de una proximidad efectiva generarán una señal detectable que indicará y/o cuantificará la presencia de Her-3 y/o un complejo de Her-3. Preferiblemente, el rango de proximidad efectiva para muchos sistemas de detección es inferior a 200 nM, más preferiblemente inferior a 50 nM.
- 40 "EGFR", "ErbB 1", "erbB-1", "HER1", "her-1" y "Her-1" se refieren al receptor del factor de crecimiento epidérmico y variantes alélicas del mismo, tal y como describen, por ejemplo, Ono y Kuwano (véase Ono y Kuwano (2006) *Cuín. Cancer Res.* 12:7242-7251) y número de acceso Genbank P00533. A menos que se indique lo contrario, los términos "EGFR", "ErbB 1", "erbB-1", "HER1", "her-1" y "Her-1" utilizados en el presente se refieren a la proteína humana.
- 45 "Epitopo" se refiere a un sitio en la superficie de una molécula, normalmente una proteína, a la que se une una molécula de anticuerpo u otro compuesto de unión. Por lo general, una proteína dispone de varios o múltiples epitopos diferentes, también denominados determinantes antigénicos, y reacciona con anticuerpos de diferentes especificidades.
- 50 "FFPE" se referirá a un grupo de células o una cantidad de tejido que son fijados, particularmente las muestras convencionales embebidas en parafina y fijadas con formalina. Estas muestras se emplean típicamente, por ejemplo, a título meramente enunciativo, en ensayos para complejos del receptor en forma de secciones finas, por ejemplo de 3-10 μm de grosor, de tejido fijado montado en el portaobjetos de un microscopio o una superficie equivalente. Estas muestras también se someten típicamente a un procedimiento de rehidratación convencional y, óptimamente, a un procedimiento de recuperación de antígeno como parte de las mediciones del ensayo o como preliminar a las mismas.
- 55 A efectos del presente, "mayor que o igual a" (es decir, \geq o \geq) puede significar en determinadas realizaciones alternativas "mayor que" ($>$). Asimismo, a efectos del presente, "menor que o igual a" (es decir, \leq o \leq) puede significar en determinadas realizaciones alternativas "menor que" ($<$).
- "Her-2", "ErbB2", "c-ErbB2", "HER2", "Her2" y "neu" se utilizan de forma intercambiable en el presente y se refieren a Her-2 nativo, así como variantes alélicas del mismo, como se describen, por ejemplo, en Semba et

al., 1985, P.N.A.S. USA 82:6497-650 y Yamamoto et al., 1986, Nature 319:230-234 y número de acceso Genbank X03363. A menos que se indique lo contrario, los términos "Her-2", "ErbB2", "c-Erb-B2", "HER2" y "Her2" utilizados en el presente se refieren a la proteína humana. El gen que codifica Her2 se denomina en el presente "erbB2."

5 "Agente que actúa sobre Her-2" se refiere, a efectos del presente, a un compuesto que puede alterar una actividad biológica de Her-2 o de una célula que expresa Her-2 o de una célula cancerosa positiva en Her-2. Estas actividades biológicas incluyen, a título meramente enunciativo, dimerización, autofosforilación, fosforilación de otro receptor, transducción de señal y similares. Entre las actividades biológicas se pueden incluir, a título meramente enunciativo, la supervivencia celular y la proliferación celular, y la inhibición de estas actividades por parte de un agente que actúa sobre Her-2 podría provocar la muerte celular directa o indirecta (por ejemplo, ADCC), la disrupción de complejos de proteína o de la formación de complejos, la modulación del tráfico de proteínas o la inhibición de enzimas. Las actividades biológicas también pueden incluir una respuesta del paciente como la que se establece en la presente solicitud. Entre los ejemplos de agentes que actúan sobre Her-2 se incluyen, a título meramente enunciativo, las moléculas grandes 4D5, pertuzumab, y trastuzumab, así como moléculas pequeñas como AEE-788 y lapatinib. Un complejo de Her-2 se utiliza para describir complejos de proteínas, tales como heterodímeros, que contienen Her-2 como componente. Un complejo de Her-2 puede incluir un homodímero de Her-2 o un heterodímero que incluye Her-2 (por ejemplo, un heterodímero de Her-2/Her-3).

20 "Her-3", "ErbB3", "c-erb-B3", "erbB-3", "HER3" y "Her3" se utilizan de forma intercambiable en el presente y se refieren a Her-3 nativo, y variantes alélicas del mismo, descritas, por ejemplo, en KrausMH, et al. (1989) Proc Natl Acad Sci USA 86:9193-9197 y Plowman GD, et al. (1990) Proc Natl Acad Sci USA. 87:4905-4909 y número de acceso Genbank P21860. A menos que se indique lo contrario, los términos "Her-3", "ErbB3", "c-erb-B3", "erbB-3", "HER3" y "Her3" utilizados en el presente se refieren a la proteína humana. El gen que codifica Her-3 se denomina en el presente "erbB3."

25 El "complejo de Her-3" se utiliza para describir complejos de proteínas, tales como heterodímeros, que tienen Her-3 como componente. Entre los ejemplos de heterodímeros que contienen Her-3 se incluyen, a título meramente enunciativo, Her-1/Her-3 y Her-2/Her-3.

30 "Agente dirigido a Her-3" o "agente dirigido a la vía de señalización de Her-3" se refiere a terapéuticos que alteran la actividad biológica de la vía de señalización de Her-3 o de miembros de la familia Her. Estas actividades biológicas incluyen, a título meramente enunciativo, dimerización, autofosforilación, fosforilación de otro receptor, transducción de señal y similares. Entre las actividades biológicas se pueden incluir, a título meramente enunciativo, la supervivencia celular y la proliferación celular, y la inhibición de estas actividades por parte de un agente que actúa sobre Her-3 o sobre la vía de señalización de Her-3 podría provocar la muerte celular directa o indirecta (por ejemplo, ADCC), la disrupción de complejos de proteína o de la formación de complejos, la modulación del tráfico de proteínas o la inhibición de enzimas. Las actividades biológicas también pueden incluir una respuesta del paciente como la que se establece en la presente solicitud. Entre los ejemplos de agentes que actúan sobre Her-3 o sobre la vía de señalización de Her-3 se podrían incluir, a título meramente enunciativo, moléculas grandes (como anticuerpos) o moléculas pequeñas (como inhibidores de quinasas de moléculas pequeñas) dirigidas a Her-3, PI3K, Akt, mTOR, ERK1/2 o PYK2. .

40 "Alto/elevado" se refiere a una medida que es mayor de lo normal, mayor de un estándar como una medida predeterminada o la medida de un subgrupo o que es relativamente mayor que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, Her-3 alto se refiere a una medida de Her-3 que es superior a una medida de Her-3 normal. Una medida de Her-3 normal se puede determinar conforme a cualquier método disponible para un experto en la técnica. Her-3 alto también se puede referir a una medida que es igual o mayor que una medida predeterminada, como un corte predeterminado. Her-3 alto también se puede referir a una medida de Her-3 donde un subgrupo de Her-3 alto presenta unos niveles relativamente más elevados de Her-3 que otro subgrupo. Por ejemplo, a título meramente enunciativo, de conformidad con la presente memoria, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos, dividiendo las muestras en torno a un punto determinado matemáticamente, como, por ejemplo, una mediana, creando de este modo un subgrupo cuya medida es alta (es decir, superior a la mediana) y otro subgrupo cuya medida es baja. Her-3 se puede medir por cualquier método conocido por un experto en la técnica, como, por ejemplo, a título meramente enunciativo, utilizando VERATAG® o cualquier método inmunohistoquímico (IHC) estándar. En algunos casos, un nivel de expresión "alto" puede comprender un rango de expresión que es muy elevado y un rango de expresión que es "moderadamente alto", donde moderadamente alto es un nivel de expresión que es superior al normal pero inferior a "muy alto". En el presente se proporcionan ejemplos de rangos para la expresión de Her-2 alta (incluyendo muy alta y moderadamente alta) y/o la expresión de Her-3 alta y/o la expresión de p95 alta.

60 "IHC, FISH y CISH" son métodos (inmunohistoquímica, hibridación fluorescente in situ e hibridación cromogénica in situ, respectivamente) empleados para detectar la presencia de entidades moleculares en células o tejidos. Por ejemplo, los receptores de membrana, tales como Her-3 y/u otros miembros de la familia de receptores EGFR, se pueden detectar utilizando estos métodos.

"Anticuerpos de control del isotipo" se refiere a anticuerpos que tienen la misma estructura de inmunoglobulina subyacente que un anticuerpo específico utilizado como compuesto de unión pero que no presenta especificidad para el epitopo diana. El uso de anticuerpos de control del isotipo permite observar cualquier unión debida a una unión no específica.

5 A efectos del presente, "probable" (y "poco probable") se refiere a un incremento (o una reducción) de la probabilidad de que se presente un artículo, objeto, cosa o persona. Así, en un ejemplo, un sujeto que es probable que responda al tratamiento con trastuzumab tiene más probabilidades de responder al tratamiento con trastuzumab en comparación con un sujeto o grupo de sujetos de referencia.

10 A efectos del presente, "prolongado" se refiere a una medida de tiempo que es mayor de lo normal, mayor que un estándar como una medida predeterminada o la medida de un subgrupo que es relativamente mayor que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, con respecto a la longevidad, una progresión larga se refiere a una progresión que se prolonga durante más tiempo que una progresión normal. Para determinar si una progresión es larga o no se puede utilizar cualquier método disponible para los expertos en la técnica. En una realización, "prolongado" se refiere a un tiempo que es superior a la evolución media necesaria para que se produzca un evento significativo en una enfermedad.

15 "Bajo/reducido" es un término que se refiere a una medida que es menor de lo normal, menor que un estándar como una medida predeterminada o una medida de un subgrupo que es relativamente inferior a la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, un Her-3 bajo significa una medida de Her-3 que es inferior que una medida de Her-3 normal en un conjunto concreto de muestras de pacientes. Una medida de Her-3 normal se puede determinar conforme a cualquier método disponible para un experto en la técnica. Her-3 bajo también puede significar una medida que es inferior a una medida predeterminada, como un corte predeterminado. Her-3 bajo también puede significar una medida en la que un subgrupo de Her-3 bajo es relativamente inferior a otro grupo. Por ejemplo, a título meramente enunciativo, conforme a la presente especificación, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos, dividiendo las muestras en torno a un punto determinado matemáticamente, como, por ejemplo, una mediana, creando de este modo un subgrupo cuya medida es baja (es decir, inferior a la mediana) y otro subgrupo cuya medida es alta (es decir, superior a la mediana). Her-3 se puede medir por cualquier método conocido por un experto en la técnica, como, por ejemplo, a título meramente enunciativo, utilizando el método VERATAG® o cualquier método inmunohistoquímico (IHC) estándar. En el presente se proporcionan ejemplos de rangos para los valores de expresión bajos de Her-3, Her-2 y p95.

20 "Lisado" se refiere a la solución que se produce cuando las membranas celulares de las células se rompen, sea por métodos físicos o químicos. Por ejemplo, los "lisados tumorales" contienen típicamente componentes representativos que las células que comprenden el tumor, incluyendo, a título meramente enunciativo, marcadores de proteína, enzimas, ácidos nucleicos y complejos de proteínas y otras moléculas que se pueden medir posteriormente en diversos ensayos.

25 A efectos del presente, una "etiqueta molecular" se refiere a una molécula que se puede medir directa o indirectamente, se puede distinguir de otras moléculas basándose en una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se están separando, incluyendo, a título meramente enunciativo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, ratio carga/masa, polaridad o similares. En una realización, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto difieren en las características de movilidad electroforética y detección óptica, y pueden ser separadas por electroforesis. En otra realización, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto pueden diferir en el peso molecular, la forma, la solubilidad, el pKa, la hidrofobicidad, la carga, la polaridad, y pueden ser separadas mediante HPLC de fase inversa o de fase normal, HPLC de intercambio de iones, electrocromatografía de capilaridad, espectroscopia de masa, cromatografía en fase gaseosa o una técnica similar.

30 La medición de las etiquetas moleculares también puede implicar el uso de interacciones moleculares secundarias, con o sin modificación posterior, para detectar, potenciar o amplificar una señal mensurable que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de un analito, como Her-3 o Her-3 en un complejo. En una realización, un conjunto de dos o más etiquetas moleculares puede interactuar dentro de una proximidad efectiva para producir una señal mensurable. Como en el caso de las etiquetas moleculares, una señal mensurable se puede generar, por ejemplo, mediante la detección de dos secuencias de ácido nucleico complementarias que se hibridarán cuando las secuencias complementarias se encuentren dentro de una proximidad efectiva. Otros ejemplos que generan una señal mensurable o que se pueden medir utilizando métodos de detección conocidos en la técnica incluyen, a título meramente enunciativo, FRET, BRET, BiFC, LCI y QPCR.

35 "Supervivencia total" (u "OS") se refiere a un tiempo medido desde el comienzo del tratamiento hasta el fallecimiento o la censura. La censura se produce por la conclusión de un estudio o un cambio de tratamiento. La supervivencia total se puede referir a una probabilidad, como, por ejemplo, una probabilidad representada en un método de Kaplan Meier de continuar vivo en un momento concreto, estando comprendido ese momento entre el comienzo del tratamiento y la muerte o censura.

- "Corte predeterminado", a efectos del presente, se refiere al valor de una medida predeterminada en sujetos que presentan ciertos atributos que permiten la mejor discriminación entre dos o más categorías de un atributo. Por ejemplo, se puede utilizar un corte predeterminado que permite discriminar entre dos categorías, como una expresión de Her-3 elevada y una expresión de Her-3 baja, para determinar la supervivencia total. Los cortes predeterminados se pueden utilizar para separar los sujetos con valores inferiores o superiores que el corte predeterminado, con objeto de optimizar el modelo de predicción.
- Una "sonda de proximidad", a efectos del presente, se refiere a un reactivo que comprende una fracción capaz de actuar dentro de una proximidad efectiva con una etiqueta molecular de un compuesto de unión para generar una señal detectable y un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de superficie celular, una proteína, como estreptavidina, una molécula pequeña, como biotina, un oligonucleótido, un análogo de un oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse específicamente a una proteína o molécula o complejo estable. Por ejemplo, una sonda de proximidad compuesta por un anticuerpo dirigido a Her-3 con una etiqueta molecular puede ser capaz de unirse a Her-3 dentro de una proximidad efectiva con uno o más compuestos de unión a Her-3, o un compuesto de unión de otra proteína de interés, que tiene una o más etiquetas moleculares unidas. En una realización, una sonda de proximidad comprende una molécula de unión y un primer ácido nucleico y una molécula de unión comprende un anticuerpo y un segundo ácido nucleico, donde el primer y el segundo ácido nucleico son complementarios entre sí y cada uno tiene una longitud predeterminada, de forma que cuando los ácidos nucleicos se encuentran dentro de una proximidad efectiva entre sí se hibridan. La hibridación se puede medir utilizando cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, los fluoróforos se pueden unir a los ácidos nucleicos como indicadores de hibridación. En una realización preferible, la hibridación se mide con un método de amplificación del ácido nucleico, como, por ejemplo, a título meramente enunciativo, el método de amplificación del círculo rodante (véase, por ejemplo, Lizardi et al., (1998) Nat Genet. 19:225-232).
- "RECIST" significará "Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos" y es un conjunto de normas publicadas que definen cuándo mejoran los pacientes con cáncer ("responden"), permanecen sin cambios ("estables") o empeoran ("progresión") durante los tratamientos. La respuesta se define por los criterios RECIST publicados, por ejemplo, en Journal of the National Cancer Institute, Vol. 92, Nº 3, 2 de febrero de 2000, y los criterios RECIST pueden incluir otras definiciones y conjuntos de normas similares publicadas.
- "Responder" al tratamiento, y otras formas de este verbo, significa, a efectos del presente, la reacción de un sujeto al tratamiento con un agente. Por ejemplo, un sujeto responde al tratamiento si el crecimiento de un tumor en el sujeto se retarda aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento si un tumor en el sujeto se reduce aproximadamente en un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más, determinado mediante cualquier medición apropiada, por ejemplo, por masa o volumen. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente que actúa sobre Her-2 si el sujeto experimenta un incremento de la esperanza de vida de aproximadamente el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más, con respecto a la esperanza de vida prevista si no se hubiese administrado el tratamiento. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente si el sujeto experimenta una supervivencia total o un incremento del tiempo hasta la progresión. Se pueden utilizar diversos métodos para determinar si un paciente responde a un tratamiento, incluyendo los criterios RECIST, tal y como se establece en el presente.
- "Muestra" o "muestra de tejido" o "muestra del paciente" o "muestra de tejido o células del paciente" significa una recopilación de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido, como una muestra de un tejido u órgano o una biopsia o aspirado fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualquier componente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido cerebroespinal, fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; o células de cualquier punto en la gestación o el desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no están naturalmente entremezclados con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, soluciones tampón, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. Las células se pueden fijar de manera convencional, como en una muestra FFPE.
- A efectos del presente, "breve" se refiere a una medida de tiempo que es menor de lo normal, menor que un estándar como una medida predeterminada o la medida de un subgrupo que es relativamente menor que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, con respecto a la longevidad del paciente, una progresión breve se refiere a una progresión que se prolonga durante menos tiempo que una progresión normal o que es más breve de lo esperado. Para determinar si una progresión es breve o no, se puede utilizar cualquier método disponible para los expertos en la técnica. En una realización, "breve" se refiere a un tiempo que es inferior a la evolución media necesaria para que se produzca un evento significativo en una enfermedad.
- "Vía de señalización", a efectos del presente, se refiere a un proceso en el que la unión de moléculas de señalización extracelulares a receptores de la superficie celular desencadena acontecimientos en el interior de la célula y/o un proceso en el que se pueden desencadenar cascadas de señalización intracelular mediante interacciones intracelulares. Por ejemplo, los receptores de tirosina quinasas son proteínas transmembrana que propagan las señales del factor de crecimiento de la superficie celular a los procesos intracelulares que controlan funciones críticas, tales como el crecimiento, la diferenciación, la angiogénesis y la inhibición de la

apoptosis. En el cáncer, a menudo estas vías de señalización se explotan para facilitar el crecimiento del tumor y la metástasis. Una de estas familias del receptor de tirosina quinasas es la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Algunos miembros de la familia del EGFR, tales como EGFR, HER2, HER3 y HER4, se presentan sobreexpresados en una amplia variedad de tipos de tumores.

5 "Evento significativo", a efectos del presente, se referirá a un evento en la enfermedad cuya importancia es determinada por un experto en la técnica. Entre los ejemplos de eventos significativos se incluyen, por ejemplo, a título meramente enunciativo, el diagnóstico primario, el fallecimiento, la recurrencia, la determinación de que la enfermedad de un paciente es metastásica, la recaída de la enfermedad de un paciente o la progresión de la enfermedad de un paciente de cualquiera de las fases anteriormente mencionadas a otra fase. Un evento
10 significativo puede ser cualquier evento importante utilizado para evaluar la OS, el TTP y/o para el uso de los criterios RECIST u otros criterios de respuesta, según determine el experto en la técnica.

A efectos del presente, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de forma intercambiable. A efectos del presente, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, preferiblemente un mamífero, incluyendo un mamífero no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un burro, una cabra, un camello, un gato, un
15 perro, una cobaya, una rata, un ratón o una oveja) y un primate (por ejemplo, un mono, como un mono Cynomolgus, un gorila, un chimpancé o un ser humano).

"Terapia seleccionada" se refiere a un tratamiento terapéutico que intenta identificar y tratar células específicas implicadas en la enfermedad sin dañar ni alterar las células normales. Los terapéuticos seleccionados pueden estar compuestos, a título meramente enunciativo, por moléculas pequeñas, como lapatinib e Iressa/Gleevec, anticuerpos monoclonales, como trastuzumab, o ácidos nucleicos, como ARNip empleado para bloquear la
20 expresión de productos genéticos que participan en procesos patológicos. Las terapias seleccionadas son útiles para el tratamiento de numerosos procesos patológicos, tales como el cáncer.

A efectos del presente, "evolución" se referirá a la cantidad de tiempo transcurrido entre un evento inicial y un evento posterior. Por ejemplo, con respecto al cáncer de un paciente, la evolución se puede referir a la enfermedad de un paciente y se puede medir valorando eventos significativos acontecidos en el transcurso de la enfermedad, donde el primer evento puede ser el diagnóstico y el evento siguiente puede ser la metástasis,
25 por ejemplo.

El "tiempo hasta la progresión" o "TTP" se refiere al tiempo medido desde el comienzo del tratamiento hasta la progresión de un cáncer o una censura. La censura se produce por la conclusión de un estudio o un cambio de tratamiento. El tiempo hasta la progresión también se puede representar como una probabilidad, por ejemplo, con un método de Kaplan-Meier, en el que el tiempo hasta la progresión puede representar la probabilidad de estar libre de progresión durante un tiempo concreto, siendo este tiempo el periodo comprendido entre el comienzo del tratamiento hasta la progresión o censura.
30

"Tratamiento" y otras formas de este término se refieren a la administración de un agente para obstaculizar una enfermedad, como el crecimiento de un cáncer, provocar una reducción del tumor en peso o volumen, ampliar el tiempo de supervivencia del sujeto y/o el tiempo hasta la progresión del tumor, o similares. Tratamiento también se puede referir a cualquier curso de tratamiento que un experto en la técnica, por ejemplo, el médico responsable, considere oportuno.
35

El término "VERATAG®" se refiere a ensayos individuales, multiplexados y multietiqueta, así como a los materiales, métodos y técnicas empleados para la realización y utilización de estos ensayos, incluyendo, a título meramente enunciativo, reactivos, procedimientos analíticos y software relacionado con estos ensayos. Los términos VERATAG®, vTag y ETAG® se utilizarán de forma intercambiable.
40

En un primer aspecto, se divulga un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo en una muestra, de forma que el método consiste en proporcionar una muestra y determinar la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo en la muestra. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido fresco, una muestra fijada, una muestra congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor de una muestra de tumor fresca o congelada. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es un cáncer de mama en un estadio temprano (es decir, adyuvante) o un cáncer de mama metastásico. En determinadas realizaciones, el nivel de expresión de Her-2 en el cáncer de mama es elevado. En determinadas realizaciones, la expresión de Her-2 elevada es un $\log_{10}H2T \geq 1,14 - 1,25$ aproximadamente. En determinadas realizaciones, la expresión elevada de Her-2 comprende una expresión que es muy elevada y/o moderadamente elevada. En determinadas realizaciones, la expresión muy elevada de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq 1,84 - 2,21$ aproximadamente. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es elevado, es menos probable o poco probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es bajo, es más probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, tal y como
45
50
55
60

se describe más detalladamente en el presente, la terapia es un agente que actúa sobre Her. En otras realizaciones, la terapia es al menos un agente que actúa sobre Her-2 o bien un agente dirigido hacia Her-3.

5 En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio.

10 En una realización preferible, el método consiste en mezclar la muestra con un compuesto de unión y determinar la presencia y/o cantidad del compuesto de unión unido a Her-3 y/o Her-3 en un complejo. En una realización preferible, el compuesto de unión se une específicamente a Her-3. En una realización preferible, el compuesto de unión comprende un anticuerpo. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8 que se establecen en el Ejemplo 2 y se muestran en la Figura 2A. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13,14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16,17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19,20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente, tal y como se muestra en la tabla IB. En una realización preferible, el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11 que se recogen en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente, y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1B para las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

TABLA 1A

25 Secuencias de cadena ligera de Her3:

>Her3.B9A11.H1_LC (clon 6-6)

30 SEC. ID. N° 9
MDSQAQVLI LLLLWVSGT CGDIVMSQSPSSLA VSAGEKVTLSCKSSQSL LNSRTRK NYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPD RFTGSGSGTDFTLTVSSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGKLEIK

>Her3.F9B10.3_LC (clon 7-3)

35 SEC. ID. N° 10
MRCLA EFLG LLLVLWIPGAIGDIVMTQGAPSVPVTPGESV SISRSSK SLLQNNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYR
MSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLGLK

40 Secuencias de cadena pesada de Her3:

>Her3.B9A11.H1_HC (clon 1-14)

45 SEC. ID. N° 11
MECNWILPFILSVTSGVYSEVQLQQPGTVLARPGASVRMSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGAIYP
GNSDTRDNQKFKGKAELTAVTSASTAYMELSSLTNEDSAVYYCTSYFDGAGYFDWFGQGTTLTVSS

>Her3.F9B10.3_HC (clon 2-1)

50 SEC. ID. N° 12

MEWSWVFLFLLSVIASVQSQVQLQQSGAEVVRPGASVTLCKASAYTFTDYELHWMRQTPVHGLEWIGASDP
ETGGSAYNQKFKGKAILTADKSSSTAFMELRSLTSEDSAVYFCTRRIFYGSRGDF'FDYWGGTS LTVSS

TABLA 1B

Regiones determinantes de la complementariedad (CDR)				
	Her3 . B9A11 . H1_IC	Her3.B9A11.H1_HC	Her3.F9B10.3_LC	Her3.F9B10.3_HC
CDR1	KSSQSLNLSRTRKNYLA SEC. ID. Nº13	SYWMH SEC. ID. Nº16	RSSKSLQNNNGNTYLY SEC. ID. Nº19	DYELH SEC. ID. Nº22
CDR2	WASTRES SEC. ID. Nº14	AIYPGNSDTRDNQKFKG SEC. ID. Nº17	RMSNLAS SEC. ID. Nº20	ASDPETGGAYNQKFKG SEC. ID. Nº23
CDR3	KQSYNLWT SEC. ID. Nº15	YYFDGAGYFDF SEC. ID. Nº 18	MQHLEYPLT SEC. ID. Nº21	RIFYFGSRGDFFDY SEC. ID. Nº24

5

TABLA 1A y 1B. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de dos anticuerpos que se unen a Her3, Her3.B9A11.H1 y Her3.F9B10.3, se muestran en la Tabla 1A. Se muestran los aislados clonales de los que se obtuvieron las secuencias y las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) se encuentran subrayadas. Las cadenas ligera y pesada se indican mediante "_LC" o "_HC", respectivamente. La Tabla 1B muestra las tres CDR de las cadenas ligera y pesada de B9A11.H1 y las cadenas ligera y pesada de F9B 10.3, respectivamente.

10

En una realización preferible, el método consiste en i) mezclar una muestra que puede contener Her-3 o Her-3 en un complejo; ii) una sonda de proximidad que es capaz de unirse a Her-3 y/o al menos otro analito, de forma que la sonda de proximidad mantiene una proximidad efectiva; y iii) al menos un compuesto de unión, de forma que el al menos un compuesto de unión es capaz de unirse a Her-3 y tener una o más moléculas de señalización unidas, donde la unión de la sonda de proximidad y el compuesto de unión dentro de la proximidad efectiva genera una señal de las etiquetas moleculares que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión es capaz de unirse específicamente a Her-3. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprende además un anticuerpo y cada anticuerpo se puede unir a un epitopo específico de Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. Nº 1-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. Nº 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. Nº 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. Nº 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. Nº 22, 23 y 24, respectivamente (Tabla 1B). En una realización preferible, el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. Nº 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. Nº 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra fijada, congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama como se ha debatido en el presente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el cáncer de mama se encuentra en un estadio temprano (adyuvante) o es un cáncer de mama metastásico. En determinadas realizaciones, el nivel de expresión de Her-2 en el cáncer de mama es elevado. En determinadas realizaciones, una expresión elevada de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq 1,14-1,25$ aproximadamente. En determinadas realizaciones, la expresión elevada de Her-2 comprende una expresión que es muy elevada y/o moderadamente elevada. En determinadas realizaciones, la expresión muy elevada de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq 1,84-2,21$ aproximadamente. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente.

45

En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra

- de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio. En una realización preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 2 logaritmos. En una realización más preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 1-1,5 logaritmos en muestras de cáncer de mama. En una realización preferible, el método proporciona un continuum cuantitativo de la expresión de Her-3. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible como mínimo a entre 1000 receptores por célula y 200 000 receptores por célula aproximadamente, según se ha determinado con estudios de precisión realizados con modelos de líneas de células bien caracterizadas y tecnologías de validación cruzada como ELISA y citometría de flujo. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 5000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 10 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 25 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición es específica, según se ha determinado utilizando anticuerpos de control del isotipo y comparaciones con métodos convencionales de IHC.
- En una realización preferible, la determinación de la presencia y/o cantidad del compuesto de unión unido a Her-3 consiste también en proporcionar un segundo compuesto de unión, de forma que el segundo compuesto de unión es capaz de unirse de forma específica al compuesto de unión unido a Her-3 y determinar la presencia y/o cantidad del segundo compuesto de unión como un dato correlacionado con la presencia y/o cantidad del compuesto de unión unido a Her-3. En una realización preferible, el segundo compuesto de unión es un anticuerpo.
- El uso de un segundo compuesto de unión que es capaz de unirse específicamente al primer compuesto de unión y que tiene una o más etiquetas moleculares que pueden ofrecer ventajas prácticas. Por ejemplo, se pueden testar varios de los primeros compuestos de unión específicos para Her-3 utilizando un único segundo compuesto de unión que tiene una o más etiquetas moleculares unidas, evitando la necesidad de unir etiquetas moleculares a cada uno de los diversos primeros compuestos de unión específicos para Her-3. En una realización preferible, el primer compuesto de unión es un anticuerpo de ratón y el segundo compuesto de unión es un anticuerpo anti-ratón cultivado en una especie distinta del ratón (por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-ratón) al que se han unido etiquetas moleculares clivables.
- Los segundos compuestos de unión están típicamente etiquetados con sondas útiles para la detección. Los sistemas de detección habitualmente empleados para detectar segundos compuestos de unión incluyen, a título meramente enunciativo, etiquetas moleculares clivables, como las descritas en el presente, radioetiquetas (por ejemplo, radioisótopos como 1-125); enzimas que convierten una sustancia química en una señal colorimétrica, fluorescente o electroquímica mensurable (por ejemplo, peroxidasas) y proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde y sus numerosos derivados).
- El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante y se puede preparar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de la misma, incluyendo estas inmunoglobulinas las diversas clases e isotipos, tales como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de las mismas pueden incluir Fab, Fv y F(ab')₂, Fab', y similares. Los anticuerpos pueden ser también anticuerpos de cadena simple, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o cualquier otro derivado de anticuerpos conocido por un experto en la técnica que conserve una actividad de unión específica para un sitio de unión concreto. Por otra parte, los agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos se pueden utilizar, cuando resulte apropiado, siempre que se mantenga la afinidad de unión.
- Para facilitar el desarrollo de métodos para medir Her-3 en muestras biológicas, se crearon anticuerpos monoclonales específicos para Her-3. Los ratones fueron inmunizados contra los péptidos de Her-3 (como se muestra en la Figura 2A) y se emplearon métodos estándar que también se recogen en el presente y que son conocidos por los expertos en la técnica para crear hibridomas. Son muchos los métodos conocidos para la creación y producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, el método del hibridoma descrito por primera vez por Koehler et al. (1975) *Nature* 256:495-497 u otros métodos descritos en la bibliografía (véase Coding, JW (1980) *J. Immunol. Methods* 34:285-308; Harlow E y Lane D (1988) en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Capítulo 6; Kennett RH et al.(1980) *Monoclonal Antibodies*, Plenum Press; ZolaH (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press).
- En una realización, el método para crear hibridomas comienza por la inmunización de un animal hospedador, como un ratón, para provocar la producción de linfocitos que generan anticuerpos dirigidos al péptido o a la proteína o proteínas de interés. Los linfocitos también se pueden inmunizar in vitro. El antígeno utilizado puede ser un péptido, una proteína o una célula que despliega el antígeno en la superficie celular. Se recogen los linfocitos y, a continuación, se fusionan utilizando métodos químicos (por ejemplo, PEG) o eléctricos (por ejemplo, electrofusión) con células de mieloma para formar células de hibridoma, típicamente en condiciones que impiden el crecimiento y/o la supervivencia de las células madre del mieloma. Las células fusionadas se dejan crecer, porque contienen enzimas que facilitan la supervivencia en el medio de cultivo. En una realización preferible, el medio de cultivo contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), que evita

el crecimiento de células que carecen de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HPRT). La HPRT es suministrada a la célula fusionada mediante el linfocito asociado, lo que permite la supervivencia del hibridoma, pero evita la supervivencia de las células madre del mieloma, que carecen de HPRT.

5 Los medios de cultivo en los que se cultivan hibridomas (por ejemplo, medios acondicionados) son típicamente sometidos a ensayo para detectar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizando diversas técnicas (véase Voller, et al. (1978) *J. Clin. Pathol.* 31:507-520), incluyendo, a título meramente enunciativo, inmunoprecipitación o el ensayo de unión in vitro, como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA; véase Engvall E (1977) en *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, editado por TMS Chang, 2:87-96, Plenum Press), radioinmunoensayo (RIA; véase
10 Sonksen PH (1974) *Brit. Med. Bull.* 30:1-103), ensayo Western blot o citometría de flujo. Los perfiles de los medios acondicionados para los hibridomas se trazaron en una serie de ensayos, entre los que se incluyen ELISA (Figura 1), Western blot (Figura 2) y citometría de flujo (Figura 3).

15 En realizaciones preferibles, los estudios que utilizan tanto células nativas como permeabilizadas y fijadas se realizan para identificar anticuerpos que pueden dar buenos resultados en las aplicaciones que emplean células o tejidos fijados, como la inmunohistoquímica (IHC). Los clones de interés se pueden subclonar mediante la limitación de la dilución o la citometría de flujo de una única célula.

20 Como sabrán los expertos en la técnica, los anticuerpos monoclonales secretados por los clones de hibridoma (o subclones) se pueden purificar utilizando procedimientos de purificación convencionales, tales como, a título meramente enunciativo, diálisis, cromatografía por afinidad, electroforesis en gel o cromatografía de proteína A-sefarosa (o proteína L-agarosa).

25 Un anticuerpo generado, B9A11 (es decir, SEC. ID. N° 9 y 11), que actuó contra el péptido CFNDPDYWH SRLFPKANA (SEC: ID. N° 6) de Her-3, fue seleccionado para su uso en los experimentos de los ensayos de Her-3 con VERATAG® que se describen en el presente. Los anticuerpos B9A11 y F9B10 se depositaron en American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110, el 13 de enero de 2010, de conformidad con los términos del Tratado de Budapest y se les asignaron los números de acceso ATCC XX-XXX e YY-YYY.

30 Numerosos métodos y reactivos se utilizan habitualmente para preparar muestras biológicas para análisis. Varios métodos se explican o mencionan en el presente y muchos otros son conocidos por los expertos en la técnica. Las muestras que contienen Her-3 adecuadas para su uso como biomarcadores pueden proceder de fuentes muy diversas, incluyendo cultivos de células, tejidos de plantas o animales, biopsias de pacientes, muestras de sangre, etc. Preferiblemente, las muestras son muestras de pacientes humanos. Las muestras se preparan para ensayos de la invención empleando técnicas convencionales, que pueden depender de la fuente de la que se obtiene una muestra. Para las biopsias y muestras médicas, se proporciona orientación en las referencias siguientes: Bancroft JD & Stevens A, eds. 1977, *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgh; Pearse, 1980, *Histochemistry. Theory and applied.* 4ª ed., Churchill
35 Livingstone, Edimburgo.

40 Algunos ejemplos de muestras de tejido de pacientes que se pueden emplear incluyen, a título meramente enunciativo, de mama, próstata, ovario, colon, pulmón, endometrio, estómago, glándula salival o páncreas. La muestra de tejido se puede obtener mediante diversos procedimientos, entre los que se incluyen la excisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra biológica pueden ser células cultivadas in vitro y recopiladas mediante centrifugación en forma de gránulos de células. En otra realización, las muestras pueden ser muestras de sangre del paciente o tipos de células sanguíneas concretos o subconjuntos de tipos de células sanguíneas (por ejemplo, placa-leuco-plaquetaria). En una realización, la muestra biológica puede ser exosomas o muestras que contienen exosomas. Los
45 exosomas son pequeñas vesículas (30-200 nm) que pueden ser secretadas por la mayoría de los tipos de células, incluyendo las células tumorales (véase Mignot et al (2006), *J. Cell. Mol. Med.* 10:376- 3 88), in vivo e in vitro. Se cree que los exosomas obtenidos de tumores desempeñan un papel importante en la capacidad de los tumores para eludir al sistema inmunitario y que tienen un gran potencial tanto para aplicaciones de diagnóstico como terapéuticas (véase Taylor y Black (1985), *J. Natl. Cancer Inst.* 74:859-867) y, por
50 consiguiente, son muestras biológicas de interés.

55 En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. Entre los ejemplos de tipos de muestras de tumor se incluyen cánceres tales como, a título meramente enunciativo, carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y cánceres de tipo mixto. En una realización, el cáncer es un cáncer de huesos, por ejemplo, sarcoma de Ewing, osteosarcoma y rhabdomyosarcoma, y otros sarcomas de tejidos blandos. En otra realización, el cáncer es un tumor cerebral, por ejemplo, oligodendroglioma, ependimoma, meningioma, linfoma, schwannoma o meduloblastoma. En otra realización, el cáncer es un cáncer de mama. En otra realización, el cáncer es un cáncer del sistema endocrino, por ejemplo, cáncer adrenal, pancreático, paratiroideo, de pituitaria y de tiroides. En otra realización, el cáncer es un cáncer gastrointestinal, por ejemplo, cáncer anal, esofágico, de la vesícula biliar, gástrico, de hígado y del intestino delgado. En otra realización, el
60 cáncer es un cáncer ginecológico, por ejemplo, cáncer cervical, endometrial, uterino, de las trompas de Falopio, enfermedad trofoblástica gestacional, coriocarcinoma, cáncer de ovario, de vagina o de vulva. En otra

realización, el cáncer es un cáncer de cabeza o cuello, por ejemplo, de laringe, orofaringe, paratiroideo o tiroideo. En otra realización, el cáncer es melanoma, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células basales. En otra realización, el cáncer es un cáncer leucémico, por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, leucemia de células pilosas o un trastorno mieloproliferativo. En otra realización, el cáncer es un cáncer de pulmón, por ejemplo, un mesotelioma o un cáncer de pulmón no microcítico. En otra realización, el cáncer es un linfoma, como un linfoma cutáneo de linfocitos T, enfermedad de Hodgkin o enfermedad no de Hodgkin. En una realización, el cáncer es un cáncer metastásico. En otra realización, el cáncer es un mieloma, por ejemplo, un mieloma múltiple. En una realización, el cáncer es un cáncer de pene. En una realización, el cáncer es un cáncer de próstata. En una realización, el cáncer es un cáncer de testículos. En una realización, el cáncer es un cáncer de tiroides, por ejemplo, papilar, folicular, medular o anaplásico o un carcinoma de tiroides no diferenciado. En otra realización, el cáncer es un cáncer del tracto urinario, por ejemplo, un cáncer de vejiga, riñón o uretra.

Los métodos para preparar células cultivadas in vitro como muestras frescas, congeladas o fijadas son conocidos por los expertos en la técnica, y en el presente se describen métodos de ejemplo. En una realización, se realizan ensayos de la invención sobre muestras de tejido que han sido fijadas y embebidas en parafina y se puede llevar a cabo un paso de desparafinación. Una muestra de tejido puede ser fijada (es decir, preservada) mediante una metodología convencional. Véase, por ejemplo, Lee G. Luna, HT (ASCP) Ed., 1960, Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 3ª edición, 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 del fijativo vendrá determinada por el propósito para el que el tejido se vaya a someter a tinción histológica o a analizar de otro modo. Un experto en la técnica también apreciará que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijador empleado.

Por lo general, una muestra de tejido se fija primero y posteriormente es deshidratada a través de una serie ascendente de alcoholes, infiltrada y embebida en parafina u otro medio de seccionamiento, para que la muestra de tejido pueda ser seccionada. Alternativamente, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido se puede embeber y procesar en parafina mediante una metodología convencional conforme a las técnicas convencionales o las descritas en el presente. Una vez que el tejido se ha embebido, la muestra se puede seccionar con un microtomo según las técnicas convencionales. Las secciones pueden tener un grosor en un rango de unos 3 micrones hasta unos 12 micrones y, preferiblemente, un grosor de unos 5 micrones a unos 10 micrones. En una realización, una sección puede tener una superficie de unos 10 mm a 1 cm aproximadamente. Una vez cortadas, las secciones se pueden unir en el portaobjetos por diversos métodos estándar. Los ejemplos de adhesivos para portaobjetos incluyen, a título meramente enunciativo, silano, gelatina y poli-L-lisina. Las secciones embebidas en parafina se pueden unir a portaobjetos de carga positiva y/o portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina.

Si se ha empleado parafina como material para el embebido, las secciones de tejido son generalmente desparafinizadas y rehidratadas antes de la detección de biomarcadores. Las secciones de tejido pueden ser desparafinizadas mediante diversas metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, se pueden emplear xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes, de acuerdo con las técnicas convencionales descritas por las referencias que se proporcionan en el presente. Alternativamente, se pueden emplear agentes de desparafinado no orgánicos disponibles en el mercado, tales como Hemo-De® (CMS, Houston, Tex.).

Los lisados celulares de células de cultivos de tejidos o tejidos frescos o congelados de mamíferos pueden prepararse en muestras mediante técnicas de lisado celular convencionales (por ejemplo, 0,14 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-Cl (pH 8.6), 0,5% Nonidet P-40, e inhibidores de proteasa y/o fosfatasa, según convenga). En el caso de tejidos de mamífero frescos, la preparación de la muestra también puede incluir un paso de desagregación del tejido, como aplastamiento, picado, trituración o sonicación.

Se generaron líneas de células estables que expresaban diversos niveles de Her-3. Las líneas de células que expresan de forma estable diversos niveles de una proteína de interés resultan útiles para validar nuevos ensayos, como el ensayo de Her-3 con VERATAG®, con respecto a numerosos parámetros, tales como las concentraciones óptimas de anticuerpo, exactitud, sensibilidad, reproducibilidad, precisión, linealidad, especificidad y rango dinámico. Se utilizaron células HEK 293 para crear las líneas de células estables que expresan Her-3. Las células HEK 293 son una línea de células concreta originalmente obtenida de células de riñón embrionario humano transformadas con ADN de adenovirus (véase Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36: 59—74). Las células HEK 293 son fáciles de cultivar, se transfectan fácilmente y han sido muy utilizadas en la investigación de la biología celular, así como en la producción de proteínas para la industria de la biotecnología durante muchos años. La generación de las líneas de células que expresan Her-3 se describe en el Ejemplo 1 y los resultados de los ensayos ELISA para determinar el nivel de Her-3 de cada una de estas líneas de células se muestran en la Figura 1.

En una realización preferible, la sonda de proximidad comprende un anticuerpo y un primer ácido nucleico y el compuesto de unión comprende un anticuerpo y un segundo ácido nucleico, donde el primer y el segundo

ácido nucleico son complementarios entre sí y capaces de hibridarse para determinar la proximidad efectiva y producir la señal, directa o indirectamente, mediante hibridación. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión son capaces de unirse específicamente a Her-3. En una realización preferible, el compuesto de unión y/o la sonda de proximidad comprenden también un anticuerpo y cada anticuerpo se une a un epitopo diferente en Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente (Tabla IB). En una realización preferible, el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra fijada, congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama, tal y como se ha descrito en el presente. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio. En una realización preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 2 logaritmos. En una realización más preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 1-1,5 logaritmos en muestras de cáncer de mama. En una realización preferible, el método proporciona un continuum cuantitativo de la expresión de Her-3. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible como mínimo a entre 1000 receptores por célula y 200 000 receptores por célula aproximadamente, según se ha determinado con estudios de precisión realizados con modelos de líneas de células bien caracterizadas y tecnologías de validación contrastada como ELISA y citometría de flujo. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 5000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 10 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 25 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición es específica, según se ha determinado utilizando anticuerpos de control del isotipo y comparaciones con métodos convencionales de IHC. Se pueden encontrar ejemplos de sondas de proximidad y compuestos de unión como los que se recogen en el presente, por ejemplo, en las Solicitudes de patente estadounidenses 7 306 904; 7 320 860 y 7 351 528.

Los ensayos de proximidad resultan cada vez más útiles para entender el papel biológico de los complejos moleculares, así como para el estudio de biomarcadores. Por ejemplo, los compuestos de unión que se unen específicamente a Her-3 o Her-3 en un complejo se pueden unir con múltiples sistemas de detección diferentes para medir la presencia y/o cantidad de Her-3 o Her-3 en un complejo. Según la presente invención, se puede utilizar cualquier método conocido por un experto en la técnica que resulte útil para determinar la cantidad de Her-3 o Her-3 en un complejo.

Estos métodos incluyen, a título meramente enunciativo, la transferencia de energía de resonancia de Foerster (FRET), la transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), la complementación bimolecular de fluorescencia, el ensayo de ligadura por proximidad (PLA), el ensayo de proximidad de centelleo (SPA) y amplificación del círculo rodante (RCA) o cualquier otro método para detectar duplicaciones de ácido nucleico formadas por la proximidad de una sonda de unión y una sonda de proximidad con cadenas complementarias de ácido nucleico.

Para realizar los métodos de la invención, se realiza una combinación de los componentes del ensayo, incluyendo la muestra a testar, los compuestos de unión y, opcionalmente, la sonda de proximidad. Por lo general, los componentes del ensayo se pueden combinar en cualquier orden. No obstante, en determinadas aplicaciones el orden en el que se añaden puede ser importante. Por ejemplo, se puede pretender controlar la unión competitiva, como en un ensayo cuantitativo. O bien se puede pretender controlar la estabilidad de un complejo formado. En estas aplicaciones, las reacciones se pueden realizar por fases.

Por lo general, las cantidades de cada reactivo se pueden determinar empíricamente. La cantidad de muestra empleada en un ensayo se determinará por el número previsto de complejos diana presentes y por los medios de separación y detección empleados para controlar la señal del ensayo. En general, las cantidades de los

compuestos de unión y la sonda de proximidad se pueden proporcionar en exceso molar con respecto a la cantidad prevista de las moléculas diana en la muestra, habitualmente a un exceso molar de al menos 1,5, más preferiblemente a un exceso de 10 o superior. En aplicaciones específicas, la concentración empleada puede ser superior o inferior*, dependiendo de la afinidad del compuesto de unión o la sonda de proximidad y del número previsto de moléculas diana presentes en una única célula.

La mezcla del ensayo se puede combinar e incubar en condiciones que permiten la unión de las sondas a las moléculas de superficie celular, normalmente en un medio acuoso, por lo general a un pH fisiológico (comparable al pH al que se cultivan las células), y se mantiene mediante una solución tampón a una concentración en un rango de unos 10 a 200 mM. Se pueden emplear las soluciones tampón convencionales, además de otros aditivos convencionales necesarios, tales como sales, medio de cultivo, estabilizantes, etc. Normalmente se emplean temperaturas fisiológicas y constantes. Normalmente las temperaturas de incubación oscilan entre unos 4°C a 70°C, habitualmente de entre unos 15°C a 45°C, más habitualmente de 25°C a 37°C.

En una realización preferible, la sonda de proximidad comprende una sonda de clivaje que tiene una fracción que induce el clivaje y el compuesto de unión o los compuestos de unión tienen una o más etiquetas moleculares unidas al compuesto de unión mediante un enlace clivable, donde el enlace clivable se puede clivar dentro de la proximidad efectiva, lo que produce una señal que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de Her-3. En una realización preferible, la sonda de clivaje y/o el compuesto de unión son capaces de unirse específicamente a Her-3. En una realización preferible, el compuesto de unión y/o la sonda de proximidad comprenden también un anticuerpo y cada anticuerpo se une a un epitopo diferente en Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente. En una realización preferible, el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente. En una realización preferible, la muestra es una muestra biológica. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido. En una realización preferible, la muestra es una muestra fijada, congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido de tumor congelado. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado de tumor. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama, tal y como se ha descrito en el presente. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE o FFPE solubilizada. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfocitos. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales en circulación. En una realización preferible, la muestra comprende líneas de células. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un rango amplio. En una realización preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 2 logaritmos. En una realización más preferible, el rango dinámico amplio es aproximadamente de 1-1,5 logaritmos en muestras de cáncer de mama. En una realización preferible, el método proporciona un continuum cuantitativo de la expresión de Her-3. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible como mínimo a entre 1000 receptores por célula y 200 000 receptores por célula aproximadamente, según se ha determinado con estudios de precisión realizados con modelos de líneas de células bien caracterizadas y tecnologías de validación contrastada como ELISA y citometría de flujo. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 5000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 10 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición o la cantidad es sensible a al menos entre 25 000 y 200 000 receptores por célula aproximadamente. En una realización preferible, la medición es específica, según se ha determinado utilizando anticuerpos de control del isotipo y comparaciones con métodos convencionales de IHC.

Se optimizó un ensayo de proximidad de dos anticuerpos. Ab-6 (LabVision), un anticuerpo monoclonal específico para Her-3 con especificidad de epitopo para la cola citoplasmática de Her-3, se conjugó con el indicador de VERATAG® (Pro 11) para su uso como sonda de proximidad (Ab-6-Prol 1). El anticuerpo monoclonal patentado, B9A11, se conjugó con biotina para su uso como sonda de clivaje (B9A11-biotina) cuando se une en un complejo con azul metileno de estreptavidina ("tijeras moleculares"). Los métodos de ensayo se describen en el Ejemplo 5. En los estudios de optimización se emplearon varias líneas de células que expresaron diversos niveles de Her-3, que oscilaban entre niveles muy altos (en una de las líneas de células HEK 293 sometidas a transfección estable, denominada 293H3-Clon 1) y niveles moderados a bajos (MDA-MB-468 y MDA-MB -453, respectivamente) hasta niveles bajos o no detectables de Her-3 (en las células SKOV3). El proceso de optimización incluyó la determinación de la concentración óptima del anticuerpo para maximizar el rango dinámico (véase el Ejemplo 7 y la Figura 6), la determinación de la exactitud del ensayo

(véase el Ejemplo 8 y la Figura 7), la comprobación de la sensibilidad, reproducibilidad y precisión del ensayo (véase el Ejemplo 9/Figura 8, Ejemplo 10/Figura 9 y Ejemplo 11/Figura 10, respectivamente), la linealidad del ensayo en diferentes tamaños de muestras (véase el Ejemplo 12 y la Figura 11), así como la especificidad del ensayo comprobando la unión no específica mediante el uso de controles del isotipo (véase el Ejemplo 13 y la Figura 12).

Lo controles del isotipo se realizan típicamente para eliminar la posibilidad de que los resultados de la unión se deban al isotipo de anticuerpo concreto y no al anticuerpo individual. Por otra parte, un experto en la técnica apreciará que cualquier "ruido" de la señal observado en los controles del isotipo se podrá sustraer de la señal total, obteniendo potencialmente un resultado más ajustado. Cuando se realizó un experimento de control del isotipo, se observó que la contribución de la unión no específica es muy reducida (véase la Figura 12).

La medición de Her-3 o Her-3 en un complejo empleando etiquetas moleculares liberables ofrece numerosas ventajas, entre las que se incluyen la separación de etiquetas moleculares liberadas de una mezcla de ensayo proporcionando un ruido de fondo notablemente reducido y un aumento significativo de la sensibilidad, separación y detección ofreciendo una práctica capacidad de multiplexación, de forma que múltiples componentes del complejo del receptor se puedan medir fácilmente de forma simultánea en el mismo ensayo. Los ensayos que emplean estas etiquetas pueden adquirir diversas formas y se divulgan en las siguientes referencias: Patentes estadounidenses nº 7 105 308; 6 627 400; 7 402 397; 7 402 398 y 7 402 399, así como en la Publicación de patente internacional nº WO 2004/011900. Se puede emplear una amplia variedad de técnicas de separación que pueden distinguir las moléculas basándose en una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se van a separar, incluyendo la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, ratio carga/masa o polaridad. En una realización, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto difieren en las características de movilidad electroforética y detección óptica, y son separadas por electroforesis. En otra realización, las etiquetas moleculares en una pluralidad o conjunto pueden diferir en el peso molecular, la forma, la solubilidad, el pKa, la hidrofobicidad, la carga, la polaridad, y son separadas mediante HPLC de fase inversa o de fase normal, HPLC de intercambio de iones, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masa o cromatografía en fase gaseosa.

Se proporcionan conjuntos de etiquetas moleculares que se pueden separar en distintas bandas o picos con una técnica de separación después de que hayan sido liberadas de los compuestos de unión. La identificación y cuantificación de estos picos proporciona una medida o perfil de la presencia y/o cantidades de Her-3. Las etiquetas moleculares dentro de un conjunto pueden ser químicamente diversas; sin embargo, habitualmente y por razones de conveniencia, los conjuntos de etiquetas moleculares están químicamente relacionados. Por ejemplo, pueden ser todos péptidos, o pueden estar compuestos de diferentes combinaciones de los mismos elementos básicos o monómeros, o pueden estar sintetizados utilizando el mismo soporte básico con diferentes grupos sustitutivos para impartir diferentes características de separación. El número de etiquetas moleculares en una pluralidad puede variar dependiendo de varios factores, entre los que se incluyen, el modo de separación empleado, las marcas usadas en las etiquetas moleculares para la detección, la sensibilidad de las fracciones de unión, la eficiencia con la que se clivan los enlaces clivables.

Las mediciones realizadas directamente sobre muestras de tejido pueden ser normalizadas incluyendo mediciones sobre dianas celulares o tisulares que son representativas del número total de células de la muestra y/o de las cantidades de determinados subtipos de células en la muestra (véase, por ejemplo, la Publicación de la solicitud de patente estadounidense nº US 2009/0191559). La medición adicional puede ser preferible, o incluso necesaria, debido a la heterogeneidad celular y tisular de las muestras de los pacientes, en particular las muestras tumorales, que pueden comprender fracciones sustanciales de células normales.

En una realización, un compuesto de unión se puede representar mediante la siguiente fórmula:

$$B-(L-E)_k$$

donde B es la fracción de unión; L es un enlace clivable y E es una etiqueta molecular. En ensayos homogéneos, el enlace clivable L puede ser un enlace lábil a la oxidación y, más preferiblemente, es un enlace que puede ser clivado por oxígeno singlete. La fracción " $-(L-E)_k$ " indica que un único compuesto de unión puede tener múltiples etiquetas moleculares unidas mediante enlaces clivables. En un aspecto, k es un número entero mayor o igual a uno, aunque en otras realizaciones, k puede ser superior a varios cientos, por ejemplo de 100 a 500, o k puede ser de varios cientos a varios miles, por ejemplo de 500 a 5000. Habitualmente, cada una de las pluralidades de los diferentes tipos de compuestos de unión tienen una etiqueta molecular diferente, E. Los enlaces clivables, por ejemplo enlaces lábiles a la oxidación, y las etiquetas moleculares E se unen a B mediante procesos químicos convencionales.

Preferiblemente, B es un anticuerpo que se une específicamente a una diana, como Her-3. En los ejemplos que se proporcionan en el presente se recogen anticuerpos específicos para epitopos de Her-3. Las composiciones de anticuerpos se pueden formar fácilmente a partir de una amplia variedad de anticuerpos disponibles en el mercado, tanto monoclonales como policlonales, utilizando los métodos divulgados en el presente.

- 5 El enlace clivable L puede ser prácticamente cualquier grupo de enlace químico que pueda ser clivado en unas condiciones que no degraden la estructura ni afecten a las características de detección de la etiqueta molecular liberada E. Siempre que se emplea una sonda de clivaje en un formato de ensayo homogéneo, el enlace clivable L es clivado mediante un agente de clivaje generado por la sonda de clivaje que actúa a corta distancia, de forma que solamente se realice el clivaje de los enlaces clivables dentro de una proximidad efectiva de la sonda de sonda de proximidad. Típicamente este agente debe ser activado realizando una variación física o química en la mezcla de reacción, para que el agente produzca una especie activa efímera que se difunda a un enlace clivable para efectuar el clivaje.
- 10 En un formato no homogéneo, dado que los compuestos de unión específicamente unidos son separados de los compuestos de unión no unidos, se puede emplear una selección de enlaces clivables y agentes de clivaje más amplia. Los enlaces clivables no solamente pueden incluir enlaces que son lábiles a la reacción con una especie activa que actúa localmente, como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete y similares, sino también enlaces que son lábiles a los agentes que operan en toda una mezcla de reacción, tales como enlaces lábiles a las bases, enlaces fotoclivables, enlaces clivables por reducción, enlaces clivables por oxidación,
- 15 enlaces lábiles a los ácidos y enlaces peptídicos clivables por proteasas específicas. Las referencias que describen muchos de estos enlaces incluyen Greene y Wuts, 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Segunda edición, John Wiley & Sons, New York; Hermanson, 1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, New York; y la Patente estadounidense 5 565 324.
- 20 La etiqueta molecular E de la presente invención puede comprender una etiqueta electrófora, tal como se describe en las referencias siguientes, cuando la separación de las pluralidades de etiquetas moleculares se realiza mediante cromatografía gaseosa o espectrometría de masas: Véase, por ejemplo, Zhang et al., 2002, *Bioconjugate Chem.* 13:1002-1012; Giese, 1983, *Anal. Chem.* 55:165-168; y las Patentes estadounidenses nº 4 650 750; 5 360 819; 5 516 931; y 5 602 273.
- 25 La etiqueta molecular E es preferiblemente un compuesto orgánico soluble en agua que es estable con respecto a las especies activas, especialmente el oxígeno singlete, y que incluye un grupo de detección o indicador. De lo contrario, E puede ser muy variable en términos de tamaño y estructura. En una realización, E tiene un peso molecular en el rango de unos 50 a unos 2500 daltons, más preferiblemente de unos 50 a unos 1500 daltons. E puede comprender un grupo de detección para generar una señal electroquímica, fluorescente o cromogénica. En realizaciones que emplean la detección por masa, E puede no tener una fracción separada para los fines de detección. Preferiblemente, el grupo de detección genera una señal fluorescente.
- 30 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 con respecto a los demás miembros de la misma pluralidad. En una realización, la característica de separación cromatográfica o electroforética es el tiempo de retención en una serie de condiciones de separación estándar convencionales en la técnica, tales como voltaje, presión de la columna, tipo de columna, fase móvil o medio de separación electroforético. En otra realización, la propiedad óptica es una propiedad de fluorescencia, como el espectro de emisión, la duración de la fluorescencia, la intensidad de la fluorescencia a una determinada longitud de onda o banda de longitudes de onda. Preferiblemente, la propiedad de fluorescencia es la intensidad de la fluorescencia. Dos o más etiquetas moleculares de una pluralidad pueden tener unos tiempos de retención o migración idénticos, pero
- 35 presentarán unas propiedades fluorescentes únicas, por ejemplo espectros de emisión espectralmente resolubles, para que todos los miembros de la pluralidad se puedan distinguir mediante la combinación de la separación molecular con la medición de la fluorescencia.
- 40 Preferiblemente, las etiquetas moleculares liberadas se detectan mediante separación electroforética y la fluorescencia de un grupo de detección. En estas realizaciones, las etiquetas moleculares que presentan unas propiedades de fluorescencia sustancialmente idénticas tienen movilidades electroforéticas diferentes, de forma que en condiciones de separación se forman picos distintos en un electroferograma. Preferiblemente, las pluralidades de etiquetas moleculares de la invención se separan mediante un aparato de electroforesis por capilaridad convencional, bien en presencia o en ausencia de una matriz de cribado convencional. Durante o después de la separación electroforética, las etiquetas moleculares son detectadas o identificadas registrando
- 45 las señales de fluorescencia y los tiempos de migración (o las distancias de migración) de los compuestos separados, o bien elaborando una gráfica de la fluorescencia relativa y el orden de migración de las etiquetas moleculares (por ejemplo, como un electroferograma). Preferiblemente, la presencia, ausencia y/o las cantidades de etiquetas moleculares se miden empleando uno o más estándares.
- 50 Una fracción inductora del clivaje, o un agente de clivaje, es un grupo que produce una especie activa capaz de clivar un enlace clivable, preferiblemente por oxidación. Preferiblemente, la especie activa es una especie química que presenta una actividad efímera, de forma que sus efectos inductores del clivaje se producen solo en las proximidades del lugar donde se generó. O bien la especie activa es inherentemente efímera, para no generar un ruido de fondo significativo más allá de la proximidad de su creación, o bien se emplea un depurador que depure de forma eficiente las especies activas, de forma que no estén disponibles para
- 55 reaccionar con enlaces clivables más allá de una corta distancia con respecto al lugar en el que se generaron. Algunos ejemplos de especies activas incluyen oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, NADH y radicales de hidroxilo, radical fenoxi, superóxido, etc. Algunos ejemplos de neutralizadores para las especies activas que
- 60

causan oxidación incluyen los polienos, carotenoides, vitamina E, vitamina C, N-conjugados aminoácido-pirrol de tirosina, histidina, y glutatona. Véase, por ejemplo, Beutner et al., 2000, Meth. Enzymol. 319:226-241.

Una consideración para diseñar ensayos que emplean una fracción inductora del clivaje y un enlace clivable es que no pueden estar tan alejados entre sí, cuando se unen a un complejo del receptor, que la especie activa generada por la fracción inductora del clivaje no pueda clivar de forma eficiente el enlace de clivaje. En un aspecto, los enlaces clivables se encuentran preferiblemente a menos de 1000 nm, y preferiblemente a 20-200 nm, de una fracción inductora del clivaje unida. Más preferiblemente, para las fracciones inductoras del clivaje del fotosensibilizador que generan oxígeno singlete, los enlaces clivables se encuentran a unos 20-100 nm de un fotosensibilizador en un complejo del receptor. Un experto en la técnica reconocerá que la proximidad efectiva de un sensibilizador concreto puede depender de los detalles de un diseño de ensayo concreto y puede estar determinada o ser modificada por la experimentación rutinaria.

Un sensibilizador es un compuesto que puede ser inducido para generar un intermedio reactivo, o una especie, por lo general oxígeno singlete. Preferiblemente, un sensibilizador empleado según la invención es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores incluidos en el ámbito de aplicación de la invención son compuestos que, tras la excitación por calor, luz, radiación ionizante o activación química, liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros más conocidos de esta clase de compuestos incluyen los endoperóxidos, tales 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 calentamiento o la absorción directa de luz por parte de estos compuestos libera oxígeno singlete. Otros sensibilizadores se divulgan en 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 unir directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes, a los anticuerpos. Existen orientaciones para elaborar estas composiciones disponibles en la literatura, como, por ejemplo, en los campos de la terapia fotodinámica, el inmunodiagnóstico, etc. Se pueden encontrar ejemplos de directrices en Ullman et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426- 5430; Strong et al., 1994, Ann. New York Acad. Sci. 745: 297-320; Yarmush et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst. 10:197-252; y las Patentes estadounidenses nº 5 709 994, 5 340 716, 6 251 581, y 5 516 636.

Existe una gran variedad de fuentes de luz disponibles para fotoactivar los fotosensibilizadores que generan oxígeno singlete. Se pueden utilizar fuentes tanto monocromáticas como policromáticas, siempre que la fuente sea lo suficientemente intensa como para producir suficiente oxígeno singlete en una duración de tiempo práctica. La longitud de la irradiación depende de la naturaleza del fotosensibilizador, la naturaleza del enlace clivable, el poder de la fuente de irradiación y su distancia de la muestra. En general, el periodo para la irradiación puede ser desde inferior a un segundo aproximadamente hasta unas 3 horas y, por lo general, se encuentra en un rango aproximado de 15 minutos a 2 horas. Algunos ejemplos de fuentes de luz incluyen láseres, como láseres de 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 lámparas de tungsteno y tungsteno/halógenas; y lámparas de destellos. Un ejemplo de dispositivo de fotoactivación adecuado para su uso en los métodos de la invención se divulgan en la Solicitud de patente internacional nº WO 03/051669. En estas realizaciones, el dispositivo de fotoactivación es un haz de diodos emisores de luz (LED) montados en una carcasa que permite la iluminación simultánea de todos los pocillos en una placa de 96 pocillos.

Algunos ejemplos de fotosensibilizadores que se pueden utilizar en la presente invención son aquellos que presentan las anteriores propiedades y los divulgados en las Patentes estadounidenses nº 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; publicadas por la Solicitud de patente europea nº 0484027; Martin et al., 1990, Methods Enzymol. 186:635-645 y Yarmush et al., 1993, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst. 10:197-252. Al igual que en el caso de los sensibilizadores, en determinadas realizaciones un fotosensibilizador puede estar asociado con un soporte de fase sólida, estando unido mediante un enlace covalente o no covalente a la superficie del soporte o incorporado al cuerpo del soporte. En general, el fotosensibilizador está asociado con el soporte en una cantidad necesaria para alcanzar la cantidad necesaria de oxígeno singlete.

Por lo general, la cantidad de fotosensibilizador se determina empíricamente mediante métodos rutinarios.

Después del clivaje, la sonda puede ser analizada para determinar la identidad de las etiquetas moleculares que han sido liberadas. Cuando se emplea un ensayo que utiliza una pluralidad de compuestos de unión, la separación de las etiquetas moleculares precederá por lo general a su detección. Los métodos tanto para la separación como para la detección se determinan durante el diseño de las etiquetas moleculares para el ensayo. Un modo preferible de separación emplea la electroforesis, en la que las diversas etiquetas se separan basándose en diferencias conocidas en sus movilidades electroforéticas.

En un segundo aspecto, la invención se implementa conforme a un método para determinar si un sujeto con cáncer es probable que responda al tratamiento con una terapia seleccionada, para predecir la evolución de una enfermedad y/o para predecir la probabilidad de un evento significativo en el transcurso del cáncer del sujeto, que consiste en la medición en una muestra biológica del cáncer del sujeto de la cantidad de Her-3, donde el método es dependiente del nivel de Her-3.

- 5 En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es elevado, es menos probable o poco probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, si el nivel de Her-3 es bajo, es más probable que el paciente responda a la terapia seleccionada. En determinadas realizaciones, tal y como se describe más detalladamente en el presente, la terapia es un agente que actúa sobre Her. En otras realizaciones, la terapia es al menos un agente que actúa sobre Her-2 o bien un agente dirigido hacia Her-3.
- 10 En determinadas realizaciones, el cáncer de mama se encuentra en un estadio temprano (es decir, adyuvante) o es un cáncer de mama metastásico. En determinadas realizaciones, el nivel de expresión de Her-2 en el cáncer de mama es elevado. En determinadas realizaciones, una expresión de Her-2 elevada es un $\log_{10}H2T \geq 1,14-1,25$ aproximadamente. En determinadas realizaciones, la expresión elevada de Her-2 comprende una expresión que es muy elevada y/o moderadamente elevada. En determinadas realizaciones, la expresión muy elevada de Her-2 es un $\log_{10}H2T \geq 1,84-2,21$ aproximadamente. También se pueden utilizar otros rangos, en función de la cohorte del paciente.
- 15 En una realización preferible, la evolución se mide determinando el tiempo entre eventos significativos en el transcurso de la enfermedad de un paciente, donde la medición es predictiva de si el paciente tiene una evolución prolongada. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario al fallecimiento. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario a la enfermedad metastásica. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario a la recaída. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión de la cirugía al fallecimiento. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión de la cirugía a la recaída. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión de la cirugía a la metástasis. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión de la enfermedad metastásica al fallecimiento. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión de la enfermedad metastásica a la recaída. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión de la recaída al fallecimiento. En una realización preferible, la evolución se mide con respecto a la tasa de supervivencia total, el tiempo hasta la progresión y/o utilizando los criterios RECIST u otros criterios de respuesta.
- 20 El ensayo de Her-3 VERATAG® se utilizó para examinar los niveles de Her-3 en una cohorte de pacientes del ensayo International Serum Her-3/neu Study Group. Estos pacientes (n=105) se seleccionaron principalmente mediante IHC, para detectar la positividad a Her-2, realizada en un lugar central por un único patólogo y todos recibían trastuzumab. Solamente los pacientes que presentaban tumores con una sobreexpresión de Her-2 (>10% de las células tumorales IHC 3+, determinado mediante HercepTest) y/o cáncer metastásico ErbB2-amplificado (con pruebas FISH positivas obligatorias en todos los casos IHC 2+) se incluyeron en este estudio (véase el Ejemplo 14 para obtener más información). El ensayo Her3 VERATAG® se realizó con las muestras de estos pacientes y de las 105 muestras en las que se realizó el ensayo, 85 presentaban unos niveles de Her-3 mensurables superiores al límite de detección (8 no tenían ningún tumor detectable, una muestra tenía un error de fluoresceína y otras ocho muestras estaban por debajo del límite de detección y se consideraron bajas/negativas en el ensayo). Los resultados se muestran en la Figura 13.
- 25 A los niveles de Her-3 y en particular los niveles de Her-3 en tumores Her-2 positivos se les ha asociado un valor de pronóstico por lo que respecta a la evolución de la progresión de la enfermedad y la supervivencia total, así como a la respuesta a la terapia y, en particular, la ausencia de respuesta a los productos terapéuticos dirigidos a la familia EGFR. Véase Sergina et al. (2007) Nature 445:437-441, Osipo et al. (2007) Int J Oncol. 30:509-520, De Alava et al. (2007) Clinical Oncol. 25:2656-2663, Ma y Bose (2008) E-Updates in HER1 and HER2 Targeting in Breast Cancer, Volumen 2, Tovey et al. (2006) J. Pathol. 210:358-362, Menendez y Lupu (2007) Breast Cancer Res. 9:111, Fuchsia/. (2006) Anticancer Res. 26:4397-4402, Lee-Hoeflich et al. (2008) Cancer Res. 68:5878-5886.
- 30 La expresión de Her-3 se ha examinado en múltiples cánceres, incluyendo tumores de pacientes tratados con terapéuticos dirigidos a miembros de la familia EGFR (por ejemplo, trastuzumab, pertuzumab, lapatinib, cetuximab, gefitinib y erlotinib), así como quimioterapéuticos. Al comparar los niveles de miembros de la familia Her con los resultados clínicos, los datos sugieren específicamente que la expresión de Her-3 y/o las cantidades relativas de Her-2 y Her-3 pueden resultar útiles como biomarcadores para el pronóstico y el diagnóstico predictivo en el cáncer de ovario (véase Amier et al. (2008) J Clin. Oncol. 26:abstract 5552, Amier et al. (2008) Meeting: 2008 Molecular Markers, Abstract 25 y Xu et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:3652-3660) y el cáncer de pulmón no microcítico (Cappuzzo et al. (2005) Brit. J. Cancer 93:1334-1340). En una realización preferible, el método consiste también en determinar si el nivel de Her-3 es alto o bajo, dividiendo un grupo de muestras de pacientes Her-2 positivos en al menos dos subgrupos, que comprenden un subgrupo con una cantidad de Her-3 elevada y al menos otro subgrupo con una cantidad de Her-3 baja, donde si el nivel de Her-3 es bajo, entonces es probable que el paciente responda a la terapia dirigida a Her-2, es probable que la evolución de la enfermedad sea prolongada y no es probable que el paciente experimente un evento significativo. En una realización preferible, el cáncer del sujeto es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, cáncer de faringe, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, glioma, carcinoma del tracto biliar, colangiocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de endometrio, cáncer de la vesícula biliar, carcinoma de células escamosas o carcinoma de células basales. En una realización preferible, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama, melanoma, cáncer

colorrectal o cáncer de ovario. En una realización preferible, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama positivo en Her-2. En una realización preferible, el cáncer de mama se encuentra en un estadio temprano (es decir, adyuvante) o es un cáncer de mama metastásico.

5 En una realización preferible, la terapia seleccionada es al menos un agente dirigido a la familia Her. En una realización preferible, el agente dirigido a la familia Her es un agente dirigido a múltiples objetivos o a un único objetivo. En una realización preferible, el agente dirigido a múltiples objetivos es un inhibidor de quinasas dual o un anticuerpo biespecífico. En una realización preferible, el agente dirigido a la familia Her es trastuzumab, lapatinib o pertuzumab. En una realización preferible, el al menos un agente dirigido a la familia Her es al menos dos agentes, donde los al menos dos agentes son uno o más anticuerpos monoclonales dirigidos a Her-2 y/o anticuerpos monoclonales dirigidos a EGFR y/o un inhibidor de quinasas dual de Her-2 y EGFR. En una realización preferible, el anticuerpo monoclonal es trastuzumab. En una realización preferible, el anticuerpo monoclonal dirigido a EGFR es cetuximab o panitumumab. En una realización preferible, el anticuerpo monoclonal dirigido a EGFR es zalutumumab, nimotuzumab y matuzumab. En una realización preferible, el inhibidor de quinasas dual es lapatinib, erlotinib o gefitinib. En una realización preferible, la terapia seleccionada es un agente que actúa sobre Her-3 o sobre la vía de señalización de Her-3. En una realización preferible, el agente dirigido a Her-3 o la vía de señalización de Her-3 es un anticuerpo monoclonal de Her-3, un inhibidor de la dimerización de Her-3, un inhibidor de la fosforilación de Her-3 y/o un inhibidor de un miembro de la vía de señalización de Her-3 seleccionado del grupo compuesto por PI3K, Akt, mTOR, ERK1/2 o PYK2. En una realización preferible, la probabilidad de responder, la probabilidad de tener una evolución prolongada y/o la probabilidad de tener un evento significativo se mide como una tasa de supervivencia total, como el tiempo hasta la progresión, como la supervivencia libre de enfermedad, la supervivencia libre de progresión y/o como una respuesta objetiva del tumor utilizando los criterios RECIST. Por transducción de la señal se entiende cualquier proceso por el que las células convierten un tipo de señal en otro. Típicamente, esto implica algún tipo de señal en la superficie celular (por ejemplo, la unión de un ligando a un receptor de superficie celular), seguido de una cascada de reacciones bioquímicas en el interior de la célula, llevadas a cabo por las enzimas, que resultan en una vía de transducción de la señal o una vía de señalización, que efectúan multitud de funciones celulares. En el caso de la familia EGFR de los receptores de tirosina quinasas, cada uno de los cuatro receptores de la familia dispone de un dominio extracelular, que comprende tanto un dominio de dimerización como un dominio de unión a ligando, así como un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad de tirosina quinasa (véase Burgess et al. (2003) *Mol Cell.* 12:541- 542). En Her-3 el dominio de quinasa no es funcional pero, a través de la dimerización con otros miembros de la familia, Her-3 puede ejercer importantes efectos en la vía de señalización. Las evidencias sugieren que se requiere la cooperación entre múltiples receptores de ErbB y ligandos para iniciar la transformación celular. Cuando se activa, esta familia de receptores sostiene una red compleja de vías de señalización. Se ha descubierto que todos los miembros de la familia EGFR se expresan y/o se presentan alterados en diversos cánceres y que pueden desempeñar un importante papel en el desarrollo del tumor, incluyendo la proliferación, apoptosis y metástasis (véase Burgess (2008) *Growth Factors* 26:263-274 y Normanno et al. (2006) *Gene* 366:2-16). El gran interés existente por dirigirse a los miembros de la familia EGFR (véase Bianco et al. (2007) *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39:1416-1431), particularmente a EGFR y Her-2, ha dado lugar a varios terapéuticos seleccionados aprobados. Basándose en prometedores datos preclínicos de modelos de ensayo tanto in vitro como in vivo, los resultados de los ensayos clínicos han sido ligeramente decepcionantes, lo que ha generado un mayor interés en otros miembros de la familia, como Her-3, así como en los miembros de la vía de señalización aguas abajo.

45 La señalización de Her-3 se ha vinculado con el cáncer y, en particular, la formación del dímero Her-2/Her-3 puede ser crucial para una mayor agresividad en los tumores que presentan una sobreexpresión de Her-2, lo que ha despertado el interés en terapéuticos seleccionados que inhiben la formación de dímeros, así como las vías aguas abajo activadas por Her-3. Her-3 resulta particularmente adecuado para la señalización porque dispone de seis sitios de unión para fosfoinositol-3-quinasas (PI3K), que a su vez, activan la proteína quinasa B (también denominada AKK). Se ha demostrado que la vía de señalización "PI3K/AKT" es necesaria para un grupo extraordinariamente diverso de actividades celulares (más concretamente para la proliferación celular y la supervivencia), lo que despierta el interés por dirigirse tanto a Her-3 como a los miembros de la vía de señalización aguas abajo, con el fin de crear nuevos productos terapéuticos seleccionados o de potenciar el valor terapéutico de los productos terapéuticos seleccionados existentes para la familia EGFR. (Para más información, véase Stern (2008) *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:215-223, Sithanandam y Anderson (2008) *Cancer Gene Ther.* 15:413-448 y Arkin y Moasser (2008) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9:1264-1276).

55 En una realización preferible, donde el cáncer es Her-2 positivo se determina mediante IHC, FISH, CISH, ARNm cuantitativo, una matriz de hibridación o VERATAG®. En una realización preferible, la determinación del nivel de Her-3 se realiza utilizando IHC, FISH, CISH, ARNm cuantitativo, una matriz de hibridación o VERATAG®. En una realización preferible, el método comprende también la determinación de si una cantidad de proteína de Her-3 es baja en comparación con la cantidad de Her-3 en el cáncer del sujeto de conformidad con un valor de corte predeterminado. En una realización preferible, el método consiste también en determinar el nivel de Her-3, dividiendo un grupo de muestras de pacientes Her-2 positivos en al menos dos subgrupos, que comprenden un subgrupo con una cantidad de Her-3 elevada y al menos otro subgrupo con una cantidad de Her-3 baja, donde si el nivel de Her-3 es alto, entonces es poco probable que el paciente responda a la

terapia dirigida a Her-2, es probable que la evolución de la enfermedad sea breve y/o es probable que el paciente experimente un evento significativo.

5 En una realización preferible, el método comprende también la determinación de que un sujeto está afectado por un cáncer Her-2 positivo que es poco probable que responda al tratamiento, según el método de la invención, y por tanto recomienda a un profesional médico la opción de tratamiento de administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente terapéutico diferente.

10 En un tercer aspecto, la invención de implementa con un anticuerpo purificado que se une a Her-3. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización preferible, el anticuerpo actúa contra uno de los péptidos que tiene las SEC. ID. N° 1-8, tal y como se establece en el Ejemplo 2 y se muestra en la Figura 2A. En una realización preferible, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13, 14 y 15, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16,17 y 18, respectivamente; y/o un anticuerpo monoclonal que comprende a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y b) una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente (Tabla IB). En una realización preferible, el anticuerpo es el anticuerpo con la secuencia de aminoácidos que tiene las SEC. ID. N° 9 y 11, tal y como se recoge en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o las SEC. ID. N° 10 y 12 que se recogen en la Tabla 1A para las cadenas ligera y pesada, respectivamente.

20 En una realización preferible, la invención se implementa con el ADN que codifica el anticuerpo. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales es aislado y secuenciado utilizando técnicas habitualmente conocidas por los expertos en la técnica de clonación. Una vez aislado, el ADN se puede unir a vectores de expresión y transfectarse en las células hospedadoras adecuadas para obtener anticuerpos recombinantes de células cultivadas (véase Plueckthun (1992) Immunological Rev. 130: 151-188).

30 Los expertos en la técnica apreciarán que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se puede modificar y que las modificaciones pueden resultar deseables para mejorar las propiedades del anticuerpo para su uso terapéutico, analítico o diagnóstico. Se apreciará asimismo que se pueden cambiar uno o más aminoácidos de estos anticuerpos mediante inserción, delección o sustitución sin disminuir de forma apreciable las características de unión del anticuerpo. Algunos ejemplos de cambios de aminoácidos serían las sustituciones utilizando aminoácidos con características moleculares similares (es decir, sustituciones conservadoras, por ejemplo cambiando aminoácidos dentro de los subgrupos siguientes de aminoácidos aromáticos, aminoácidos ácidos, aminoácidos básicos o aminoácidos con amidas o sulfuros). Se pueden realizar otras inserciones o sustituciones no conservadoras sin alterar de forma apreciable la integridad molecular ni las características de unión. Asimismo, determinados cambios de aminoácidos o conjuntos de cambios de aminoácidos mejorarán las propiedades del anticuerpo, incluyendo, a título meramente enunciativo, una mejor afinidad de unión, una mayor estabilidad (por ejemplo, resistencia a las proteasas), selectividad y/o facilidad de producción. Los métodos para cambiar secuencias de aminoácidos y/o seleccionar moléculas con mejores propiedades son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, en los anticuerpos intactos, el grado de identidad de la secuencia tras la modificación es al menos del 50% y más preferiblemente al menos del 75% y más preferiblemente al menos del 90-95%.

45 En una realización preferible, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos a Her-3 para desarrollar otras moléculas dirigidas a Her-3. Las modificaciones de los anticuerpos que se describen en el presente pueden resultar deseables para mejorar las cualidades incluyendo, a título meramente enunciativo, el incremento de la función efectora, la reducción de la inmunogenicidad, el aumento de la estabilidad, la mejora de las propiedades farmacológicas, como la vida media en suero, y la contribución a la facilidad y los resultados de producción. Cada una de estas moléculas seleccionadas se considera incluida en el ámbito de aplicación de la invención contemplada.

50 En una realización preferible, se pueden utilizar anticuerpos humanizados que comprenden las regiones de unión a antígeno de los anticuerpos que se describen en el presente (véase la Tabla 1A) en un marco humano para aplicaciones terapéuticas. Se han documentado distintos métodos para humanizar anticuerpos (véase Jones et al. (1986) Nature 321:522-525, Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327 y Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536). Típicamente, las secuencias no humanas de dominio variable se detectan por ordenador dentro del conjunto de secuencias de dominio variable de cadena ligera o pesada humanas para encontrar las secuencias marco variables humanas más cercanas a las secuencias de roedor (véase Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296-2308, Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 186:901-917). De manera alternativa, se pueden utilizar marcos de consenso (véase Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-4289 y Presta et al. (1993) J. Immunol. 151:2623-2632). En una realización preferible, se utiliza el diseño asistido por ordenador para seleccionar secuencias que confieren estabilidad y conservan o mejoran las características de unión.

- En otra realización, las CDR del anticuerpo se pueden utilizar para crear moléculas de unión seleccionadas que se unen al mismo epítopo en Her-3, pero que están incluidas en un marco que no es un anticuerpo nativo. Por ejemplo, un experto en la técnica apreciará que existen métodos disponibles para crear moléculas de unión en las que el marco puede ser una porción de un anticuerpo, por ejemplo, un fragmento scFv o F(ab')₂ (véase WO 93/16185 y Carter et al.(1992) *Bio/Technology* 10:163-167, respectivamente). Un experto en la técnica apreciará también que una proteína completamente no relacionada (como una beta-lactamasa bacteriana) puede desplegar convenientemente el dominio o los dominios de unión para formar un compuesto de unión. En este sentido, los anticuerpos relacionados, tal y como se definen en el presente, se considerarán incluidos en el ámbito de aplicación de la invención.
- El anticuerpo puede actuar terapéuticamente únicamente a través de la unión o a través de otras propiedades (por ejemplo, actividad enzimática o cabezas tóxicas). En una realización, la proteína seleccionada puede ser modificada para ejercer un efecto terapéutico o un efecto terapéutico mayor mediante citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En otra realización, las toxinas se pueden conjugar con el anticuerpo o la proteína seleccionada. Entre los ejemplos de toxinas de moléculas pequeñas se incluyen, a título meramente enunciativo, la maitansina, calicheamicina y CC-1065 (véase, por ejemplo, Carter y Senter (2008) *Cancer J.* 14:154-169). Adicionalmente, se pueden unir radioetiquetas a los anticuerpos para crear productos terapéuticos seleccionados. Las toxinas biológicas también se pueden unir a proteínas seleccionadas e incluyen, a título meramente enunciativo, toxina de la difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, abrina y ricina (véase Kreitman (2006) *AAPSJ.* 18:E532-551).
- En una realización más, los anticuerpos seleccionados (o fragmentos de los mismos) se pueden fusionar con enzimas para su uso en una terapia con profármaco enzimático dirigido por anticuerpos (ADEPT; véase Bagshawe(1987)*Er. J. Cancer* 58:700-703 y Senter et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4842- 4846). En otra realización, los anticuerpos o proteínas seleccionadas se pueden fusionar con moléculas, como polietilenglicol, que mejoran las propiedades farmacológicas, como la vida útil en suero (véase Harris y Chess (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-221).

Ejemplos

La presente invención se puede entender mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que se ofrecen únicamente a título enunciativo:

Ejemplo 1: Generación de líneas de células estables que expresan diversos niveles de proteína HER3

- Un ADNc disponible en el mercado (Origene Technologies, Inc.) para HER3 de longitud completa (NM 001982.2) se digirió con las enzimas de restricción Not I y Xba I y el fragmento resultante se subclonó en el vector de expresión seleccionable pcDNA.3 1 Zeocin. El plásmido resultante se transformó en bacteria y se analizó para verificar la correcta inserción. Se verificaron las secuencias de los clones positivos, se expandieron en bacterias y el plásmido se purificó utilizando el kit Qiagen Maxi-prep. Se compraron células de riñón embrionario humano (HEK-293) de American Type Culture Collection y se mantuvieron en DMEM suplementado con un 10% de FBS, 1x penicilina- estreptomycin (100X es 10 000 U/ml penicilina-G y 10 000 ug/ml estreptomycin), y Glutamax (GIBCO) a 37°C en 5% CO₂. El día antes de la transfección, las células se dividieron hasta una confluencia de aproximadamente el 25-30% y se incubaron hasta el día siguiente en medios que no contenían penicilina-estreptomycin. A continuación, las células se transfectaron con Fugene HD (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al día siguiente los medios se sustituyeron por medios completos nuevos y las células se incubaron durante 48 horas antes de añadir 400 mg/ml de Zeocin (Invitrogen) en medios completos. La concentración de Zeocin se determinó realizando una curva de muerte utilizando diversas concentraciones de Zeocin sobre células 293 de tipo salvaje que no contienen el plásmido transfectado. Se aislaron aproximadamente 16 clones resistentes a Zeocin utilizando anillos de clonado y se congelaron en nitrógeno líquido. Un subconjunto de los clones originales se podría expandir con éxito y someterse a ensayo utilizando un kit ELISA específico para HER3 (R&D Systems, Inc), siguiendo las instrucciones del fabricante, y verificar si presentan una sobreexpresión de HER3 (Figura 1). Un clon con una expresión elevada de HER3 demostrado mediante ELISA (293-H3 clon 1) se seleccionó como control para su uso en el ensayo optimizado.

Ejemplo 2: Generación y selección de anticuerpos contra HER3

- Un anticuerpo monoclonal específico para HER3 (Ab-6) con especificidad de epítopo para la cola citoplasmática de Her-3 se compró a Lab Vision. El indicador de VERATAG® (Pro 11) y azul de metileno conjugado con estreptavidina ("tijeras moleculares") se sintetizaron y purificaron de acuerdo con el protocolo anteriormente descrito (véase, por ejemplo, más arriba y la Patente estadounidense 7 105 308). Se realizaron conjugados de anticuerpo-VERATAG® y anticuerpo-biotina, es decir Ab6-Prol 1 y B9A11-biotina, utilizando sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) como conector siguiendo el protocolo del fabricante y los productos de conjugación se purificaron mediante HPLC (Agilent). Una serie de anticuerpos patentados se generaron como sigue: Los ratones se inmunizaron con células 293 clon 13 fijadas o una serie de péptidos que representaban diferentes epítopos incluidos en la región C-terminal de la proteína HER3 (Figura 2A). Durante el periodo de inmunización, cada ratón recibió varias inmunizaciones durante un periodo de cuatro semanas. Los hibridomas se produjeron y los clones se aislaron utilizando dilución limitante. Se trazaron los perfiles de los medios

5 acondicionados de los clones individuales mediante una serie de ensayos, incluyendo detección mediante CellSpot™ o ELISA, seguidos de un aumento de escala y una nueva detección mediante inmunohistoquímica (IHC) (Figura 2) y posteriormente, por último mediante VERATAG® Technology, utilizando un método de liberación química (azul de metileno) (Figura 2C) o el método de liberación de luz de anticuerpo dual (Figura 2D). Varios anticuerpos demostraron un buen comportamiento utilizando estos métodos y se describen en la Figura 2A. Uno en particular, B9A11, fue el más robusto y ofreció el mejor rango dinámico y sensibilidad, y se utilizó para desarrollar el formato final del ensayo, tal y como se describe en el Ejemplo 5 más abajo.

Ejemplo 3: Generación de bloques y secciones FFPE de un grupo de líneas de células que expresan diversos niveles de HER3 mediante FACS y ELISA.

10 Se compraron tres líneas de células con diversos niveles de expresión de proteína de HER3, MDA-MB-453, MD A-MB -468 y SKOV-3, a American Type Cell Culture Collection. Las líneas de células MDA-MB-453 y MDA-MB-468 se mantuvieron a 37°C y en un 5% de CO2 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), 10% de FBS, 1x penicilina-estreptomina y 1x Glutamax. Las células SKOV3 se mantuvieron a 37°C y en un 5% de CO2 en McCoy's 5a Media suplementado con 10% de FBS, 1x penicilina-estreptomina y 1x Glutamax (GIBCO). Las células de 293-H3 clon 1 se mantuvieron a 37°C y en un 5% de CO2 en DMEM suplementado con un 10% de FBS, 1x penicilina-estreptomina y 1x Glutamax. Las células se cultivaron a una confluencia cercana en al menos 10 placas de cultivo de 500 mm para cada línea de células. Tras retirar el medio, las células se lavaron una vez con 1x PBS frío y se añadieron 15 ml de 1XPen-fix (Thermo Scientific) en cada placa. Se rasparon las células y la solución de células se fijó hasta el día siguiente (>16 horas) a 4°C. Tras la fijación hasta el día siguiente, las células se centrifugaron a 3200xg durante 15 minutos. Los gránulos de células se transfirieron a una junta tórica de goma, se rasparon con un papel de filtro y se situaron en un cestillo de procesamiento. Se utilizó un procesador Tissue-Tek automático para el procesamiento. En resumen, los gránulos de células se expusieron a concentraciones crecientes de alcohol, Clear-rite (sustituto de xileno) y parafina. Tras el procesamiento, el gránulo se embebió en un bloque utilizando una unidad de embebido en parafina. Todos los solventes utilizados para el procesamiento de gránulos de células se adquirieron en Richard Allen Scientific. La proporción del mismo lote de células se testó para detectar el número de receptores HER3 utilizando citometría de flujo por el método siguiente. Se preparó un lisado celular completo a partir de la preparación de células para cuantificar los niveles de receptor HER3 utilizando un kit ELISA disponible en el mercado y siguiendo las recomendaciones del fabricante (Human ErbB3-DuoSet ELISA; R&D systems). Se cortaron secciones de 7 um de grosor con un microtomo (LEICA) y se colocaron en portaobjetos de vidrio de carga positiva (VWR). Los portaobjetos se secaron al aire durante 30 minutos y a continuación se cocieron en un horno calentado a 70°C durante 1,5 horas. Todos los portaobjetos de las muestras se almacenaron a 4°C para futuros ensayos. Los resultados de ELISA, citometría de flujo, la IHC y la comparación con VERATAG® se muestran en la Figura 3.

35 **Ejemplo 4: Generación de secciones a partir de secciones FFPE de cáncer de mama disponibles en el mercado**

Los bloques de cáncer de mama FFPE se compraron a Asterand. Se cortaron secciones de 5 um de grosor con un microtomo (LEICA) y se colocaron en portaobjetos de vidrio de carga positiva (VWR). Las secciones se secaron al aire durante 30 minutos y, a continuación, se cocieron en un horno a 70°C durante 1,5 horas. Todos los portaobjetos de las muestras se almacenaron a 4°C para futuros ensayos. Los tumores de mama anteriormente seccionados del material clínico también se utilizaron para estos estudios. Los ejemplos de tumores teñidos con H y E en portaobjetos de vidrio se muestran en la Figura 4.

Ejemplo 5: Ensayo de Her-3 con VERATAG® en tejido de mama y líneas de células embebidas en parafina y fijadas con formalina (FFPE)

45 Las muestras FFPE fueron desparafinadas/rehidratadas utilizando una serie de solventes. En resumen, los portaobjetos se empaparon secuencialmente en xileno (2x, 5 min), etanol al 100% (2x, 5 min), etanol al 70% (2x, 5 min) y agua desionizada (2x, 5 min). La recuperación del epitopo inducida por calor de las muestras rehidratadas se realizó en un soporte de portaobjetos que contenía 250 ml de 1 x DAKO (pH 9.0) (Lab Vision) utilizando una olla a presión (Biocare). Tras enfriarse durante 30 minutos a temperatura ambiente, los portaobjetos se enjuagaron una vez con agua desionizada. Se dibujó un círculo hidrófobo en el portaobjetos utilizando un bolígrafo hidrófobo (Zymed) para retener los reactivos en los portaobjetos. A continuación, las muestras se bloquearon durante 1 hora con una solución tampón de bloqueo que contenía un 1% de suero de ratón, un 1,5% de BSA y un cóctel de inhibidores de fosfatasa y proteasa (Roche) en 1x PBS. Tras retirar la solución tampón de bloqueo con aspiración, se añadió una mezcla de anticuerpos conjugados con VERATAG® (Ab-6: Lab Vision, 1ug/ml) y conjugados con biotina (B9A1 1; patentados por Monogram, 2ug/mL) preparados en una solución tampón de bloqueo y se incubaron las reacciones de unión hasta el día siguiente en una cámara humidificada a 4°C con agitación. La mezcla de anticuerpos se aspiró y las muestras se lavaron con solución tampón de lavado que contenía 0,25% de TritonX-100 en 1*PBS y se añadió metileno azul conjugado con estreptavidina a una concentración de 2,5ug/ml en 1*PBS. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente, el exceso de reactivo de azul de metileno-estreptavidina se aspiró y las muestras se lavaron una vez en solución tampón de lavado para, a continuación, someterse a tres cambios de agua desionizada. Se añadió una solución tampón de iluminación que contenía 3 pM de fluoresceína y dos marcadores internos de CE (MF

y ML) en 0,01x PBS a las secciones de las muestras. El VERATAG® unido se liberó a unos 4°C mediante clivaje fotoactivado utilizando un iluminador de matriz de LED interno equipado con un bloque de refrigeración electrónico (Torrey Pine Scientific). Tras la iluminación, los productos intermedios de VERATAG® se reducen a una forma cuantificable mediante la adición de borohidruro de sodio. La muestra de CE que contenía los indicadores de VERATAG® liberados se obtuvo de la sección de tejido anterior en los portaobjetos y los indicadores de VERATAG® liberados en las muestras de CE se separaron y detectaron en un instrumento ABB 130 CE (matriz capilar de 22-cm; Applied Biosystems) bajo condición de inyección de CE de 6kV y 50 seg. a 30°C. El flujo general del ensayo H3T en el laboratorio clínico se ilustra en la Figura 5.

Ejemplo 6: Análisis de CE máxima, normalización del área del tumor y normalización del lote

La identificación y cuantificación de VERATAG® se realizó utilizando el software VERATAG® Informer (véase, por ejemplo, la Publicación estadounidense nº 2007- 0203408-A1). Para analizar las señales de VERATAG® en un electroferograma de CE en bruto se utilizaron dos marcadores internos de CE, MF (primer marcador) y ML (último marcador), para identificar los picos de VERATAG® de acuerdo con su movilidad electroforética o tiempo de migración, t, con respecto a los dos marcadores, es decir $[t(\text{VERATAG}^\circledast)-t(\text{MF})]/[t(\text{ML})-t(\text{MF})]$. Los picos de VERATAG® identificados se cuantificaron después mediante el cálculo del área del pico para cada VERATAG®. Para corregir la variabilidad en la recuperación de VERATAG® de la sección de tejido, y la variabilidad intralaboratorio en materia de eficiencia de la inyección de CE y/o la sensibilidad de detección en la matriz capilar, se añadió fluoresceína (3 pM) en la solución tampón de iluminación, y se sometió a electroforesis conjunta como control de referencia interna para el procesamiento de cada muestra. A continuación el área de cada pico de VERATAG® se indica como RFU o RPA por normalización de área del pico de VERATAG® (área del pico de VERATAG®) con respecto al pico de fluoresceína interna (área del pico de fluoresceína / 3pM). Esta se cuantifica como $\text{RPA} \cdot \text{EB vol/TA}$ para las muestras de tumor variables (=área del pico relativa multiplicada por el volumen de solución tampón de iluminación (EB) cargada en la sección de la muestra; dividido por el área del tumor en mm^2 ($\text{RPA} \cdot \text{IB vol/TA} = \text{pmol/L} \cdot \text{L/mm}^2 = \text{pmol/mm}^2$). Concretamente, la intensidad de la señal de fluorescencia de la CE de un indicador de VERATAG®, o el área del pico (PA VeraTag®), se proporciona en unidades de fluorescencia relativas (altura de la señal) integradas en el tiempo (RFU-S/S). El área relativa del pico ($\text{RPA}_{\text{VeraTag}^\circledast}$) se mide normalizando el área del pico de VERATAG® (PA VeraTag®) con respecto al estándar interno de fluoresceína de una concentración conocida (PAF), y es por tanto proporcional a la concentración inicial del analito que se pretende medir. Dado que la señal del ensayo VERATAG® es una lectura cuantitativa que varía en función del contenido del tumor, una comparación exacta de las señales del ensayo VERATAG® de las distintas muestras clínicas requiere un ajuste para las diferencias en este parámetro. Así pues, el contenido del tumor se mide en la recopilación de los datos de la señal del ensayo VERATAG® de la muestra y el contenido del tumor se utiliza para normalizar el resultado del ensayo VERATAG®. Cabe señalar que, si la muestra del tumor es muy pequeña o muy grande, se ajustan los volúmenes de reacción (es decir, volumen del anticuerpo, azul de metileno conjugado con estreptavidina y reactivos de la solución tampón de iluminación) y este ajuste se refleja en la normalización del contenido del tumor. Tras ajustar las áreas del pico de VERATAG® para el tiempo de migración, la fluoresceína, la solución tampón de iluminación y el área del tumor, los controles y muestras se normalizan multiplicando el área de su pico ajustada por el respectivo factor de normalización del lote (BNF) calculado. Cada valor de RPA ajustado se multiplica por el respectivo BNF para obtener un valor de RPA normalizado. Dado que, por definición este valor de RPA normalizado carece de unidades, su valor se expresa en unidades VERATAG®. Todos los valores normalizados notificables (no erróneos y no saturados) para una determinada muestra son promediados para determinar un valor final para esa muestra.

Se han desarrollado diversas comprobaciones del control de calidad para garantizar la máxima calidad de los datos.

1. Fluoresceína fuera de rango. Un trazo de la muestra con fluoresceína fuera de rango es errónea. El rango de fluoresceína se calcula utilizando la mediana del valor de fluoresceína ajustado +/-XX%. El valor XX%, típicamente 20-40%, es ajustable y está asociado con plantillas individuales. Los picos de la muestra son erróneos si la altura absoluta del pico es > 7000 unidades, denominado pico saturado.
2. RPA debe ser mayor o igual que 0,03.
3. Si una muestra no diluida de pico convertido es errónea debido a que presenta un $\text{RAP} < 0,03$, entonces todas las muestras diluidas de pico convertido correspondientes también serán erróneas.
4. Al menos dos controles del pico convertido deben presentar valores requeridos para que la normalización del lote del pico convertido continúe.
5. Una muestra o control con mala calidad del trazo es errónea.
6. Si los controles realizados únicamente con la solución tampón de iluminación presentan contaminación, puede que las muestras sean erróneas si la calidad del trazo puede verse afectada, por ejemplo si el pico contaminante se solapa con el pico liberado.
7. Un lote con una mala normalización del lote es erróneo.

8. Un lote con un factor de normalización del lote anormalmente elevado es erróneo.

Para cada muestra, tras el ensayo VERATAG®, se realizó una tinción con H y E (hematoxilina y eosina) y una evaluación para garantizar la presencia de células tumorales y para poder realizar una estimación del área del tumor. Estos portaobjetos se desparafinan, hidratan, tiñen y, a continuación, se deshidratan y montan utilizando procedimientos estándar antes del examen microscópico.

Ejemplo 7: Optimización de la concentración de anticuerpos para aumentar el rango dinámico

Las concentraciones óptimas del anticuerpo Ab-6 y B9A1 1 se determinaron variando las concentraciones finales en el ensayo de HER3 total VERATAG® HER3 (como se ha descrito anteriormente) en un grupo de líneas de células que abarcaba la totalidad del rango dinámico del ensayo (293H3-clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468, y SKOV3). A continuación, estos resultados se compararon con los niveles de cambios previstos en función de la citometría de flujo de HER3 y de los resultados de ELISA con la preparación del bloque FFPE de la misma línea de células. Se seleccionó una concentración óptima de 2mg/ml de B9A11 -biotina y 1 mg/ml de Ab-6 Pro-11 para valorar el rendimiento basándose en la detección exacta de HER3 en comparación con los niveles de cambios previstos frente a ELISA y citometría de flujo de este mismo conjunto de líneas de células, tal y como se muestra en la Figura 6, donde se ha rodeado con un círculo un ratio 2:1 de B9A11 frente a Ab-6.

Ejemplo 8: Exactitud del ensayo de HER3 total VERATAG®

Un lote del ensayo de HER3 total VERATAG® se realizó utilizando tres replicados competentes de cuatro líneas de células bien caracterizadas (293H3-clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y SKOV3) y, a continuación, se realizó una comparación para determinar la exactitud de la medición de VERATAG® con los datos de la citometría de flujo y ELISA generados internamente. El 100% de los resultados coincidió con los datos internos de la citometría de flujo y del ELISA en el sentido de que 293H3-clon 1 >MDA-MB-453 >MDA-MB-468 >SKOV3. No se observó ningún solapamiento entre los niveles de señal de ninguna de las muestras de las cuatro líneas de células, es decir que cada una de las líneas de células se separó por completo. Los conjuntos de datos internos sobre los niveles totales de HER3 se generaron mediante ELISA y citometría de flujo. Los resultados de exactitud para las cuatro líneas de células se presentan en la Figura 7. Los resultados de la citometría de flujo de HER3 fueron muy similares a los resultados de ELISA de HER3, en el sentido de que se demostró la preservación del mismo orden de clasificación utilizando estas tecnologías de validación cruzada.

Ejemplo 9: Sensibilidad del ensayo de HER3 total VERATAG®

La sensibilidad del ensayo de HER3 total VERATAG® se determinó comparando un lote que contenía ocho replicados de la línea de células de control con una expresión de HER3 baja, MDA-MB-468, con ocho replicados de la línea de células de control con una expresión de HER3 baja/negativa, SKOV3. Los valores para cada replicado de MDA-MB-468 se compararon con los replicados de SKOV3 mediante comparaciones por pares para determinar la sensibilidad. El 100% (64/64) de las comparaciones por pares entre MDA-MB-468 y SKOV3 dieron como resultado MDA-MB-468>SKOV3 (Figura 8).

Ejemplo 10: Reproducibilidad del ensayo de HER3 total VERATAG®

La reproducibilidad interensayo se determinó realizando ocho lotes separados del ensayo de HER3 total VERATAG® anteriormente descrito con cuatro líneas de células bien caracterizadas (293H3-clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468 y SKOV3) utilizando diferentes instrumentos (CE, iluminadores), diversos operadores y realizando el ensayo durante un periodo de cuatro semanas. Tras los procedimientos de normalización de los lotes, se compararon los datos de los ocho lotes para determinar la reproducibilidad. La reproducibilidad en todo el rango dinámico se situó en un 8-15% (véase la Figura 9).

Ejemplo 11: Precisión del ensayo de HER3 total VERATAG®

La reproducibilidad interensayo se determinó realizando un lote/línea de células del ensayo de HER3 total VERATAG® y comparando el rendimiento de 15 replicados de cada una de las tres líneas de células de control (293H3-clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468). Se realizaron comparaciones por pares de los 15 replicados de cada lote para determinar la precisión del ensayo. El 95% de los datos de 293H3-clon 1 se encontraban dentro de un nivel de cambio de 1,2, el 100% de los datos de MDA-MB-453 se encontraban dentro de un nivel de cambio de 1,23 y el 95% de los datos de MDA-MB-468 se encontraban dentro de un nivel de cambio de 1,37. Los resultados se muestran en la Figura 10.

Ejemplo 12: Linealidad del ensayo de HER3 total VERATAG®.

La linealidad del resultado del ensayo de HER3 VERATAG® se determinó tomando líneas de células de control bien caracterizadas (293H3-clon 1, MDA-MB-453, MDA-MB-468) y realizando sucesivos experimentos "reducidos" para crear secciones FFPE con las dimensiones siguientes 1,1/2, 1/4, 1/16. A continuación, estas secciones "reducidas" se sometieron al ensayo de H3T VERATAG® y los datos normalizados del área de la sección final se compararon por pares para entender la linealidad del ensayo con respecto al tamaño de la sección (Figura 11). La línea de células MDA-MB-453 demuestra linealidad hasta aproximadamente 1/16 del

tamaño de muestra original, mientras que MDA-MB-468 demuestra linealidad hasta aproximadamente 1/2 del tamaño de muestra original. Los resultados se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 13: Especificidad del ensayo de HER3 total VERATAG®

5 Las muestras de tumor obtenidas del paciente y los controles de las líneas de células se sometieron al ensayo de HER3 total VERATAG® y utilizando anticuerpos de control del isotipo. Para Ab-6-Prol 1 de HER3, el control del isotipo emparejado fue IgG1-Prol 1. Para B9A11-biotina de HER, el control del isotipo emparejado fue IgG 1-biotin. La señal de estas reacciones no es específica de antígeno y representaría unos antecedentes no específicos. Las muestras se procesaron en cada uno de los tres formatos siguientes y dentro del mismo lote frente a frente:

10 Formato 1: HER3 Ab6-Prol 1/B9A11 -biotina (formato normal)

Formato 2: HER2 Ab6-Prol 1/IgG1-biotina

Formato 3: IgG1-Prol 1/B9A11-biotina

15 Los resultados de las muestras de cada formato de IgG1 (Formato 2 y Formato 3) se compararon con el control negativo, SKOV3, presente en cada lote (parámetro de comparación A); los resultados de las muestras también se compararon con las respectivas señales reales de HER3 total (Formato 1). Los resultados se muestran en la Figura 12.

Ejemplo 14: Medición de los tumores de mama clínicos y rango dinámico

20 La población del estudio comprendía pacientes (n=105) que fueron prospectivamente observados durante la terapia basada en trastuzumab en una única institución entre 1999 y 2006 (el ensayo International Serum Her-2/neu Study Group). Solamente se incluyeron pacientes ambulatorios (ECOG PS 0-2, edad >18 años, esperanza de vida prevista >12 semanas) con una sobreexpresión de HER-2/neu (>10% de las células tumorales IHC 3+ determinado mediante HercepTest; DAKO Diagnostics, Austria) y/o MBC con ERBB2 amplificado (con análisis FISH positivo obligatorio en todos los casos IHC 2+). Por otra parte, los pacientes no debían haber estado expuestos anteriormente al trastuzumab y debían presentar una progresión de la enfermedad mensurable bidimensionalmente dentro de las cuatro semanas anteriores al inicio del tratamiento (excluyendo las lesiones anteriormente radiadas). Las muestras de este grupo de estudio se sometieron al ensayo de H3T VERATAG® en ocho lotes separados. Para cada lote, se realizaron los análisis del pico de CE, así como análisis del área del tumor y el lote se sometió a la correspondiente normalización. De las 105 muestras de pacientes sometidas a ensayo, 85 presentaban unos niveles de H3T mensurables superiores al límite de detección, ocho muestras de pacientes no presentaban tumor detectable, una muestra presentaba un error de fluoresceína que obligaba a excluir los datos y, por último, había ocho muestras de pacientes que se encontraban por debajo del límite de detección del ensayo y se consideró que presentaban una expresión de H3T baja/negativa. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 15: Determinación del corte óptimo para la respuesta a trastuzumab

35 Utilizando un análisis de detección posicional, se determinó un corte óptimo por el que los pacientes por encima de un valor de corte estadísticamente significativo presentaban un tiempo hasta la progresión (TTP) desfavorable frente a los pacientes que se encontraban por debajo de este corte (Figura 14). El valor de corte era aproximadamente la media de los resultados de la población sometida a ensayo (0,158, HR.=23, p=0,0004). TTP se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento con trastuzumab hasta la progresión (SWOG) o censura y OS se definió como el tiempo desde el inicio del tratamiento con trastuzumab para el fallecimiento o la censura. Si se analiza la supervivencia total de esta población de pacientes no se podría determinar ningún valor de corte significativo; sin embargo, existía una tendencia de OS utilizando el valor de corte de 0,158 (HR=1,7; p=0,059).

Ejemplo 16: Análisis de Kaplan-Meier (KM) para el TTP

45 Se utilizó un valor de corte de H2T previamente señalado ($\log H2T \geq 1,14$) para subdividir a los pacientes en grupos de HER2 normal (N=26, mediana TTP = 4,1 meses) y sobreexpresión de HER2 (N=55, media TTP =11,1 meses, HR=0,43, p=0,0002). En el grupo de sobreexpresión de HER2, los niveles de expresión de H3T por encima de los valores de corte óptimos (H3T > 0,158; Figura 14), definidos por una media inferior de tiempo hasta la progresión (N=25, mediana TTP = 6,1 meses) prevista por la detección posicional en comparación con la expresión de H3T por debajo del valor de corte (N=30, mediana TTP=13,1 meses, HR=2,7, p=.0002). Los análisis univariados de riesgos proporcionales de Cox con los que se examinó al subgrupo que presentaba una sobreexpresión de HER2 identificó el nivel de H3T (superior frente a inferior a un valor de corte concreto) como el factor de predicción más importante del TTP (HR = 2,98, p = 0,0004). Estos resultados se muestran en la Figura 15.

Ejemplo 17: Expresión total de HER3 analizada mediante VERATAG® en otras enfermedades malignas

El ensayo de H3T VERATAG® se realizó con varias enfermedades malignas diferentes además del cáncer de mama, tales como cáncer de colon, de ovario o tumores sinoviales (Figura 16). Se observaron rangos

dinámicos similares para todos estos cánceres con el siguiente orden de clasificación del rango: ovario>carcinoma sinovial>/=colon. El rango dinámico de estos tumores es de 0,5-1,5 logaritmos dependiendo del cáncer.

Ejemplo 18: Medición de HER3 conjuntamente con P95 y correlación con la respuesta a trastuzumab

5 Se utilizó un valor de corte de P95 anteriormente señalado (Solicitud de patente estadounidense 12/629 037) para continuar estratificando a los pacientes con una sobreexpresión de HER2 anteriormente descritos, tras la subdivisión inicial basada en su nivel de HER3, al objeto de producir cuatro subgrupos de pacientes mostrados en la Figura 17. Los pacientes con un nivel bajo de P95 y HER3, definido como inferior a un valor de corte óptimo previsto mediante detección posicional, presentaban una media del tiempo hasta la progresión (TTP= 10 15,0 meses) mayor que cualquier otro subgrupo (prueba de logrank para la tendencia $p < 0,0001$). Los pacientes con un nivel elevado de P95 y HER3 presentaban las medias más bajas de tiempo hasta la progresión (TTP - 3,2 meses). Los resultados se muestran en la Figura 17.

Ejemplo 19: Medición de HER2, HER3 y P95 y correlación con la respuesta a trastuzumab

15 La población de pacientes del Ejemplo 17 se subdividió en función de su nivel de HER2, P95 y HER3, tal y como se muestra en la Figura 18. Los pacientes que presentan un nivel de HER2 alto, P95 bajo y HER3 bajo, definido mediante una metodología de detección posicional, demostraban un tiempo hasta la progresión mayor que los pacientes con un nivel alto de HER2 y un nivel alto de HER3 o P95, o de ambos, con este último grupo registrando un tiempo hasta la progresión similar que los pacientes que tenían un valor de HER2 bajo determinado mediante el ensayo de H2T VERATAG®. Dentro del subgrupo con unos niveles de expresión de 20 HER2 normales (H2T bajo), los grupos de FISH positiva y FISH negativa experimentaron un tiempo hasta la progresión similar.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Laboratory Corporation of America Holdings
- 5 Bates, Michael
Cook, Jennifer W
Diedrich, Gundo
Goodman, Laurie
Mukherjee, Ali
- 10 Parry, Gordon
Sperinde, Jeff
Williams, Stephen J.
- 15 <120> MÉTODOS PARA DETERMINAR LA RESPUESTA DEL PACIENTE A TRAVÉS DE LA MEDICIÓN DE HER-3
- <130> 57618-386600
- <150> US 61/145 029
- 20 <151> 2009-01-15
- <150> US 61/176 630
<151> 08/05/2009
- 25 <150> US 61/187 962
<151> 2009-06-17
- <160> 24
- 30 <170> Versión de la patente 3.5
- <210> 1
<211> 24
<212> PRT
- 35 <213,> Secuencia artificial
<220>
<223> Nota: Artificial = construcción sintética
- <400> 1
- 40

ES 2 535 723 T3

Leu Gly Ser Ala Leu Ser Leu Pro Val Leu Asn Arg Pro Arg Gly Thr
1 5 10 15

Gly Ser Gln Ser Leu Leu Ser Pro
20

<210> 2

5 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223>Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 2

Ser Ala Tyr His Ser Gln Arg His Ser Leu Leu Thr Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Leu Ser Pro

15

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

25 <400> 3

Val Gly Ser Asp Leu Ser Ala Ser Leu Gly Ser Thr Gln Ser Cys Pro
1 5 10 15

Leu His Pro Val Pro Ile
20

<210> 4

30 <211> 21

ES 2 535 723 T3

Cys Phe Asp Asn Pro Asp Tyr Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala
1 5 10 15

Asn Ala

<210> 7

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 7

Cys Pro Asp Tyr Trp His Ser Arg Leu Phe Pro Lys Ala Asn Ala Gln
1 5 10 15

Arg Thr

15

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

25 <400> 8

Cys Phe Pro Lys Ala Asn Ala Gln Arg Thr
1 5 10

30 <210> 9

<211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 9

5

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Val Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys
130

<210> 10

10 <211> 132

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 10

ES 2 535 723 T3

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15
 Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Pro Ser Val Pro
 20 25 30
 Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
 35 40 45
 Leu Leu Gln Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
 50 55 60
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
 65 70 75 80
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110
 Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Gly Leu Lys
 130

5

<210> 11

<211> 139

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

15 <400> 11

ES 2 535 723 T3

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
 1 5 10 15

Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Thr Val Leu Ala Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Arg Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Asp Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Glu Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Ser Tyr Tyr Phe Asp Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Phe
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

5

<210> 12

<211> 142

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 12

15

ES 2 535 723 T3

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Ile Ala Ser
 1 5 10 15

Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Arg
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Ala Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Leu His Trp Met Arg Gln Thr Pro Val His Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ser Asp Pro Glu Thr Gly Gly Ser Ala Tyr Asn
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95

Thr Ala Phe Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Thr Arg Arg Ile Phe Tyr Phe Gly Ser Arg Gly Asp Phe
 115 120 125

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
 130 135 140

- 5 <210> 13
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 13

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 14

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

10

<400> 14

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

15 <210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 15

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Trp Thr
1 5

25

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

35 <400> 16

Ser Tyr Trp Met His
1 5

<210> 17

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

10

<400> 17

Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Asp Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

15 <210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 18

Tyr Tyr Phe Asp Gly Ala Gly Tyr Phe Asp Phe
25 1 5 10

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

35 <400> 19

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Gln Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 20

5 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 20

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

15

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

<400> 21

25

Thr Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu
1 5

<210> 22

<211> 5

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Nota: Artificial = construcción sintética

35

<400> 22

Asp Tyr Glu Leu His
1 5

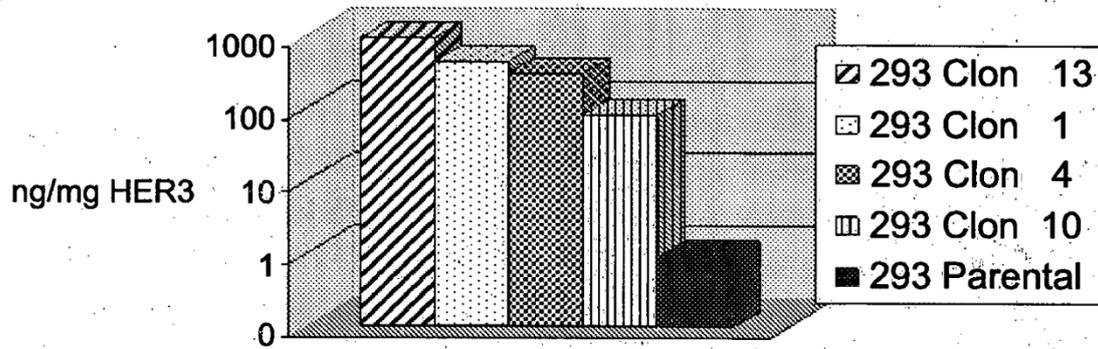
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que comprende:
- 5 a) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 13,14 y 15, respectivamente, y una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 16, 17 y 18; y/o
- b) una región variable de cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 19, 20 y 21, respectivamente, y una región variable de cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 con las secuencias que se recogen en las SEC. ID. N° 22, 23 y 24, respectivamente; y/o
- 10 c) una secuencia de aminoácidos que comprende las SEC. ID. N° 9 y 11 para las cadenas ligera y pesada, respectivamente; y/o
- d) una secuencia de aminoácidos que comprende las SEC. ID. N° 10 y 12 para las cadenas ligera y pesada, respectivamente.
- 15 2. Un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de Her-3 o Her-3 en un complejo en una muestra de un sujeto. Este método comprende:
- mezclar la muestra con un anticuerpo de la reivindicación 1 y determinar la presencia y/o cantidad del anticuerpo unido a Her-3 y/o Her-3 en un complejo.
- 20 3. Un método para determinar si un sujeto con cáncer es probable que responda al tratamiento con un agente dirigido a la familia Her, para predecir la evolución de la enfermedad y/o para predecir la probabilidad de que se produzca un evento significativo durante la evolución del cáncer del sujeto, que comprende el método conforme a la reivindicación 2.
4. El método de la reivindicación 3, donde si el nivel de Her-3 es elevado, es menos probable que el paciente responda al agente dirigido a la familia Her; y si el nivel de Her-3 es bajo, es más probable que el paciente responda al agente dirigido a la familia Her.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, donde el método comprende la medición y/o cuantificación de la presencia y/o cantidad de al menos uno de los elementos siguientes: Her-3 total, homodímeros de Her-3 o heterodímeros de Her-3.
- 30 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, que comprende también la medición de p95 en la muestra; y preferiblemente si la cantidad de p95 y la expresión de Her-3 es baja, entonces es probable que el paciente responda al agente dirigido a la familia Her y/o que el paciente tenga una evolución prolongada.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, donde la muestra comprende una muestra de tumor; y/o la muestra comprende una muestra de cáncer de mama, una muestra de cáncer colorrectal, una muestra de cáncer de ovario, una muestra de cáncer de pulmón no microcítico, o una muestra de cáncer gástrico.
- 35 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, donde la muestra comprende una muestra de cáncer de mama.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, donde la muestra comprende una muestra de cáncer de mama en un estadio temprano o una muestra de cáncer de mama metastásico; y/o la muestra es una muestra FFPE o una muestra FFPE solubilizada.
- 40 10. El método de la reivindicación 8, donde la muestra comprende una muestra Her-2 positiva.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde el método consiste en:
- a) mezclar i) la muestra del sujeto; ii) una sonda de proximidad que es capaz de unirse a Her-3, donde la sonda de proximidad tiene una proximidad efectiva; y iii) al menos un compuesto de unión, de forma que el compuesto o los compuestos de unión son capaces de unirse a Her-3 y de tener una o más moléculas de señalización unidas, donde la unión de la sonda de proximidad y el compuesto de unión dentro de la proximidad efectiva produce una señal de las etiquetas moleculares que se correlaciona con la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo;
- b) detectar la señal de las etiquetas moleculares para determinar la presencia y/o cantidad de Her-3 y/o Her-3 en un complejo;
- donde la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprende el anticuerpo de la reivindicación 1.
- 50 12. El método de la reivindicación 11, donde la sonda de proximidad comprende una sonda de clivaje que tiene una fracción que induce el clivaje y el compuesto de unión o los compuestos de unión tienen una o más etiquetas moleculares unidas al compuesto de unión mediante un enlace clivable, donde el enlace clivable se puede clivar dentro de la proximidad efectiva, lo que produce una señal que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de Her-3.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, donde el agente dirigido a la familia Her comprende un agente dirigido a uno o varios objetivos.
14. El método de la reivindicación 13, donde el agente dirigido a la familia Her comprende un inhibidor de quinasas dual o un anticuerpo biespecífico.
- 5 15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 o 14, en las que el agente dirigido a la familia Her comprende trastuzumab, lapatinib, pertuzumab, cetuximab, panitumumab, erlotinib o gefitinib.
16. El método de la reivindicación 15, donde el agente dirigido a la familia Her comprende trastuzumab.
17. El método de cualquiera de la reivindicaciones 3 a 16, donde la probabilidad de responder, la probabilidad de tener una evolución prolongada y/o la probabilidad de que se produzca un evento significativo se mide como
10 al menos uno de los elementos siguientes: índice de supervivencia total, tiempo hasta la progresión, supervivencia libre de enfermedad, supervivencia libre de progresión, tiempo hasta una recurrencia distante, cociente de riesgo y/o respuesta objetiva del tumor o beneficio clínico, utilizando los criterios RECIST.
18. Un anticuerpo conforme a la reivindicación 1, para su uso en cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 2 a 17.

15

ELISA: Grupo de líneas de células



Línea de células	HER3 (ng/mg)
293H3-Clon 13	967
293H3-Clon 1	460
293H3-Clon 4	314
293H3-Clon 10	82
Cepa salvaje 293	1,0

Figura 1

Secuencia de péptidos	Longitud	Aminoácidos de HER3	ID del clon	ELISA/IHC/VeraTag
LGSALSLPVLNRPRGTGSQSLLSP	24	1027-1050		
SAYHSQRHLLTPVTPLSP	19	1130-1148	A2	Positivo
VGSDLSASLGSTQSCPLHPVPI	22	1227-1248		
CQGPQGHQAPHVHYARLKLTLRS	21	1296-1315		
. LEEVELEPELDDLDLEAE	19	1000-1018		
CFDNPDYWHSRLFPKANA	18	1323-1339	B9A11.B11	Positivo
CPDYWHSRLFPKANAQRT	18	1326-1342	F9.F9B10	Positivo
CFPKANAQRT	10	1334-1342	F9	Positivo

Figura 2A

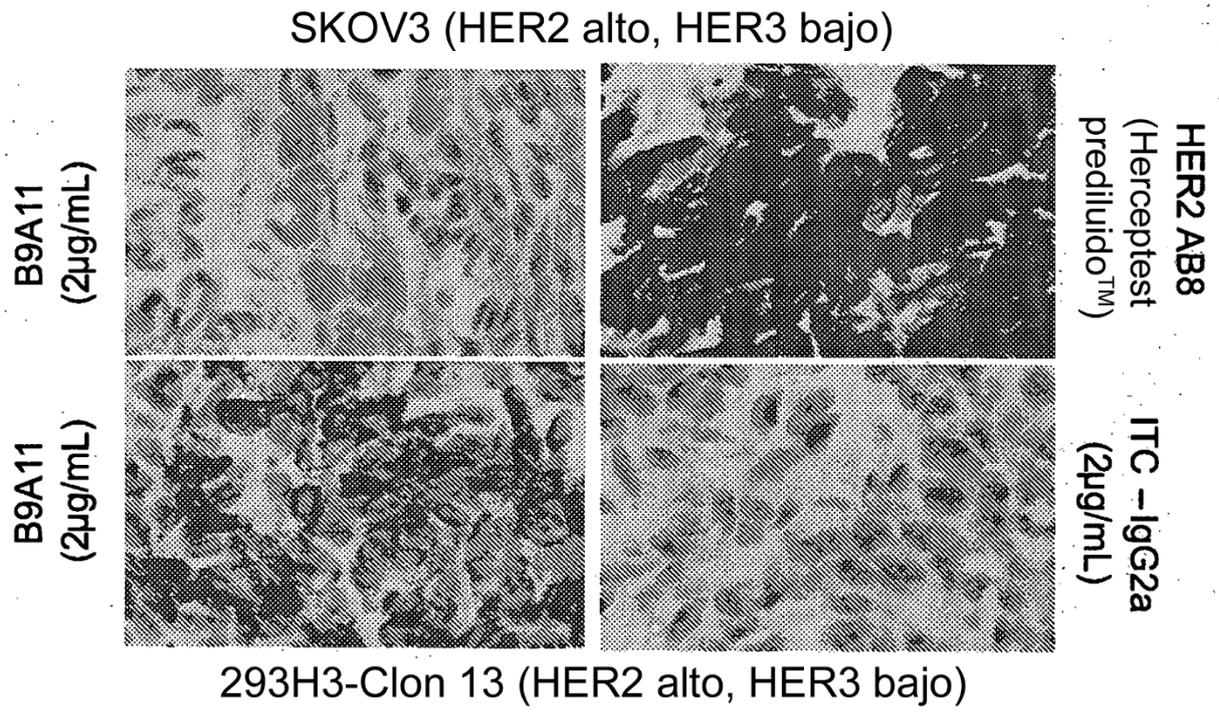


Figura 2B

Línea de células	Puntuación de inmunohistoquímica (IHC)	VeraTag	ELISA HER3[ng/mg]	Citometría de flujo (Receptores/célula)	IHC
293H3-Clon 1	> 3	10,01	502,2	188 045	
MDA-MB-453	1+	1,00	46,2	25 716	
MDA-MB-468	0	0,24	2,5	5669	
SKOV3	0	0,06	0,4	500	

Figura 3

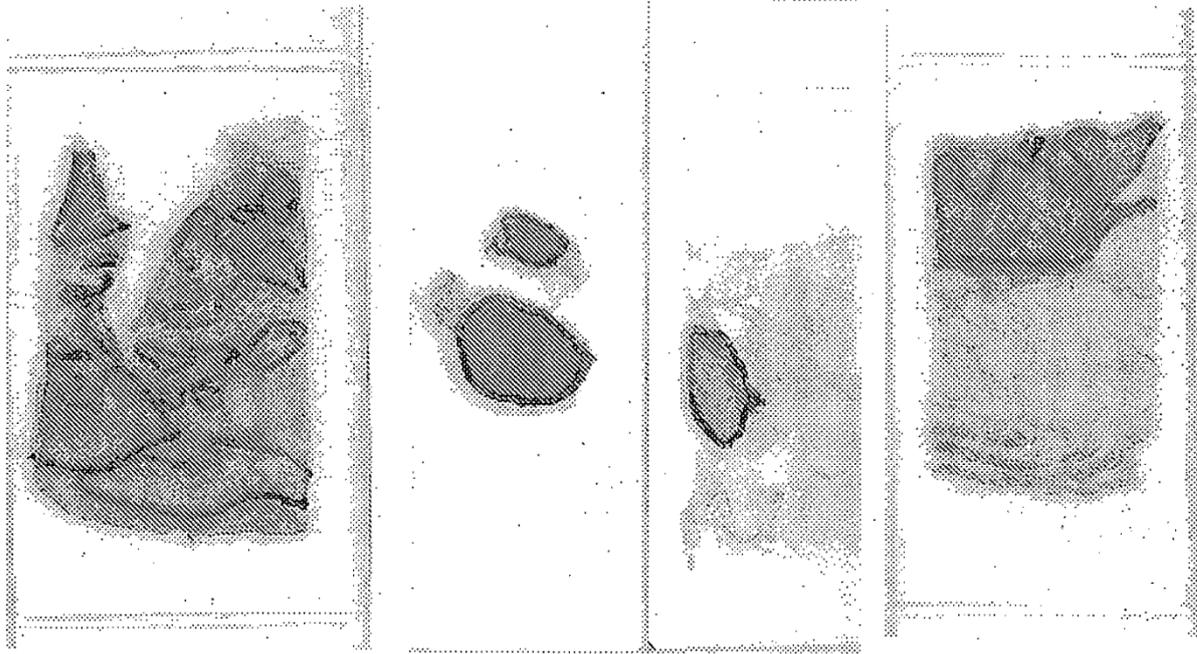


Figura 4

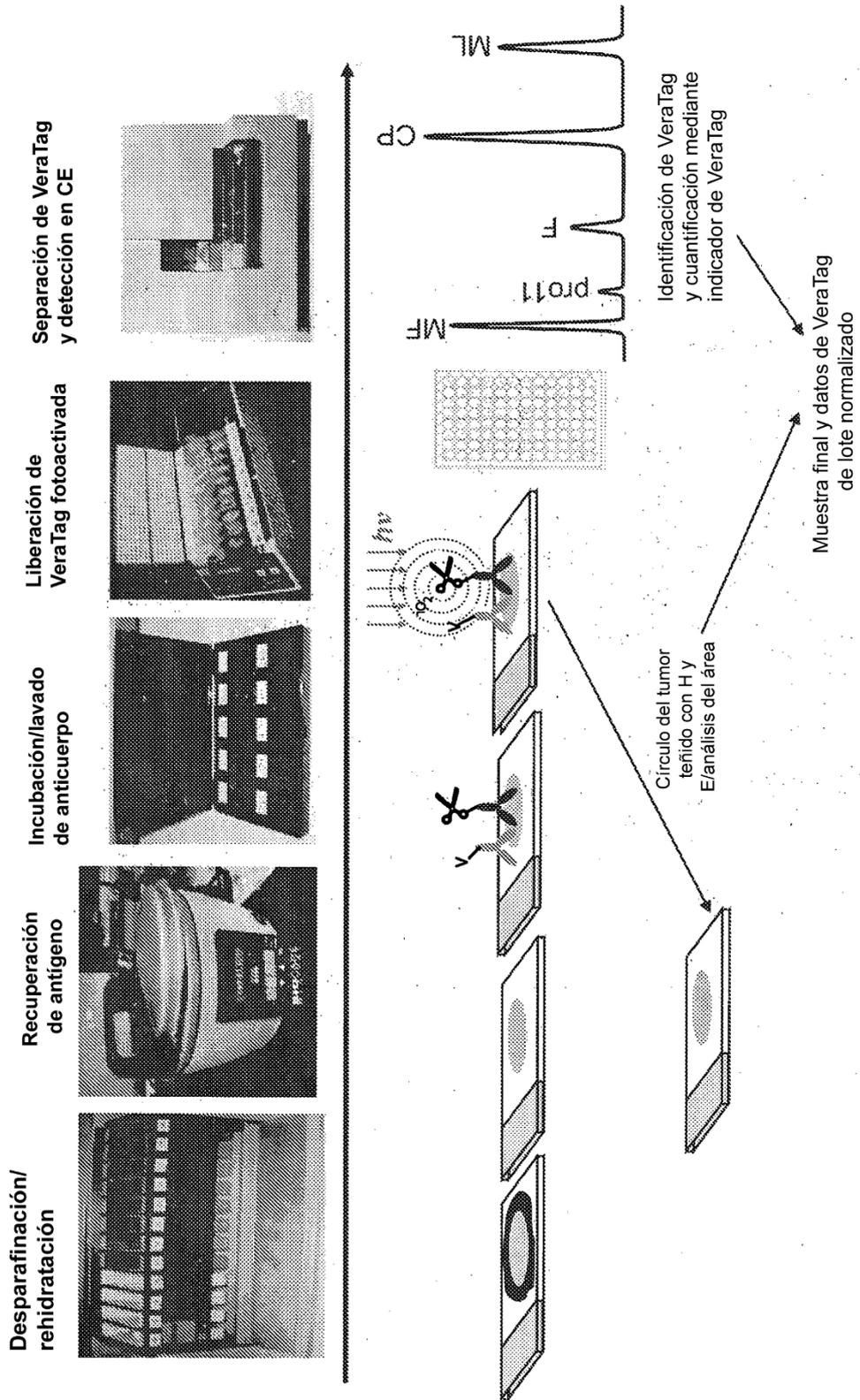
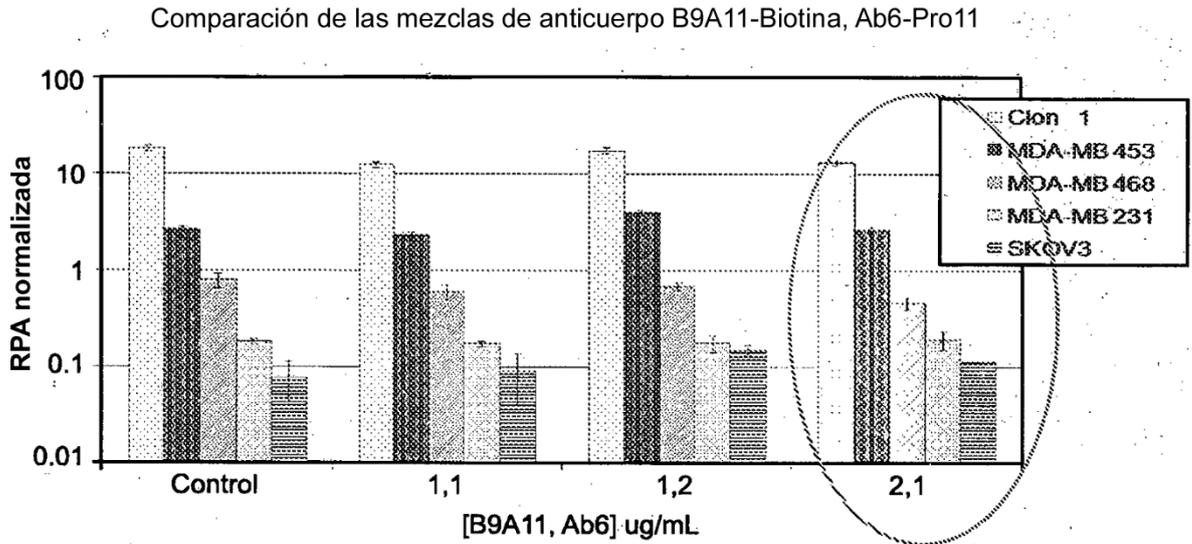


Figura 5



	Clon 1:453	Clon 1:468	Clon 1:SKOV3	453:468	453:SKOV3	468:SKGV3
Previsto	9,3	42,3	177,8	4,5	19,0	4,2
Gen 1.0	7,0	23,5	242,0	3,4	34,8	10,3
1,1	5,5	21,0	142,0	3,8	25,7	6,8
1,2	4,3	25,4	116,7	5,9	26,9	4,6
2,1	5,0	28,3	119,1	5,7	23,9	4,2

Figura 6

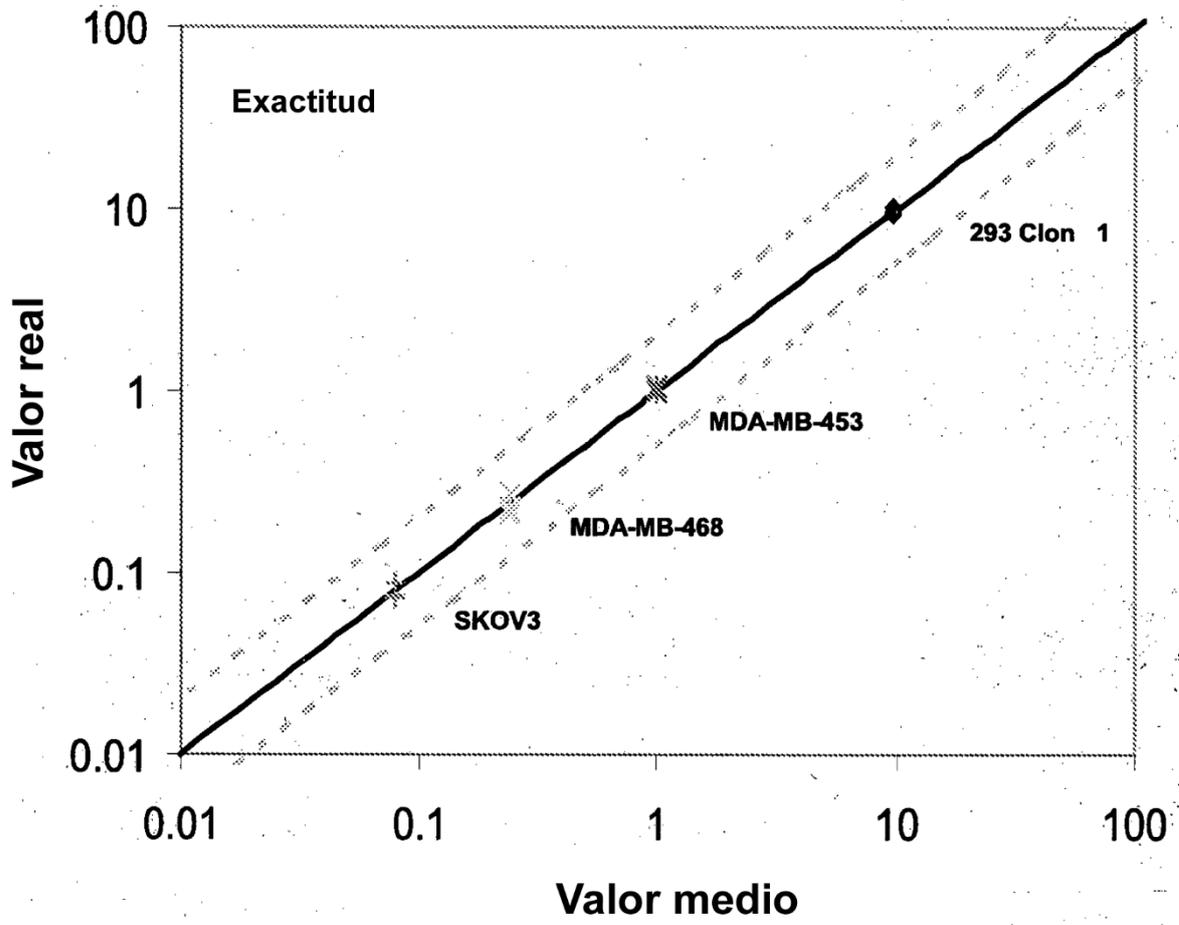


Figura 7

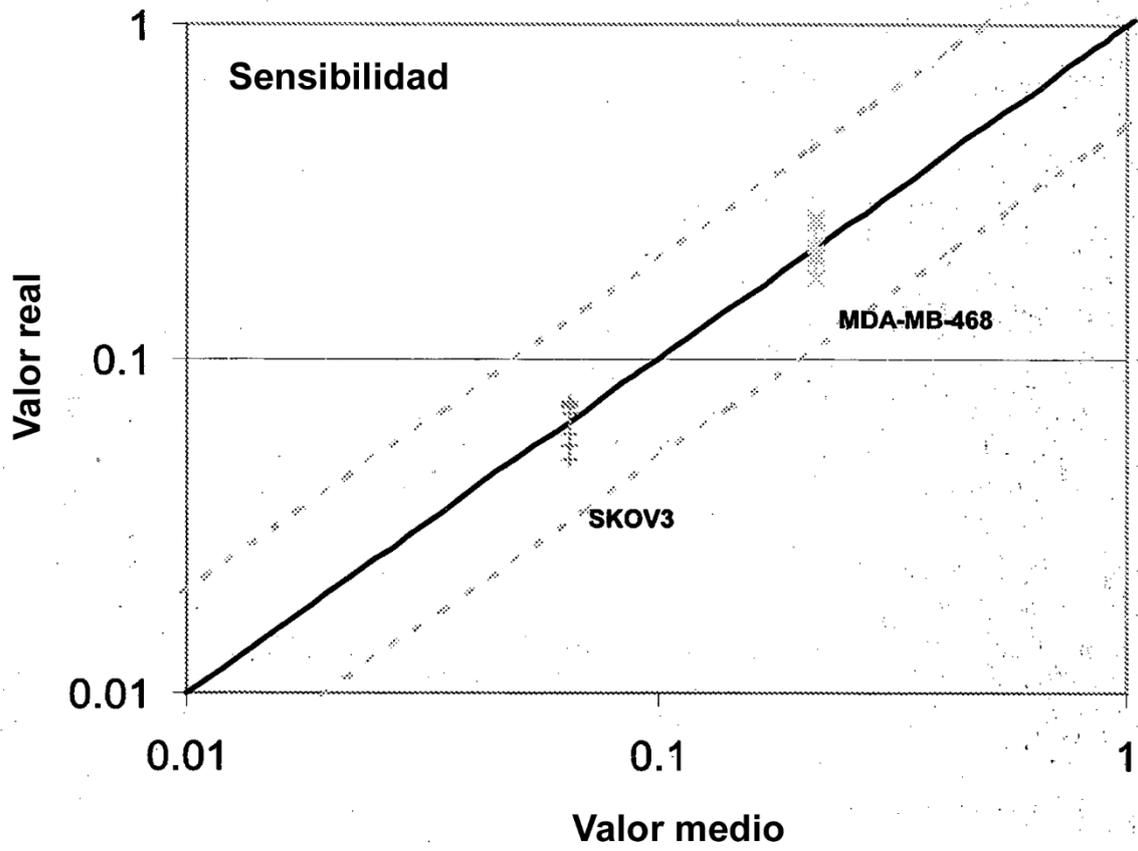


Figura 8

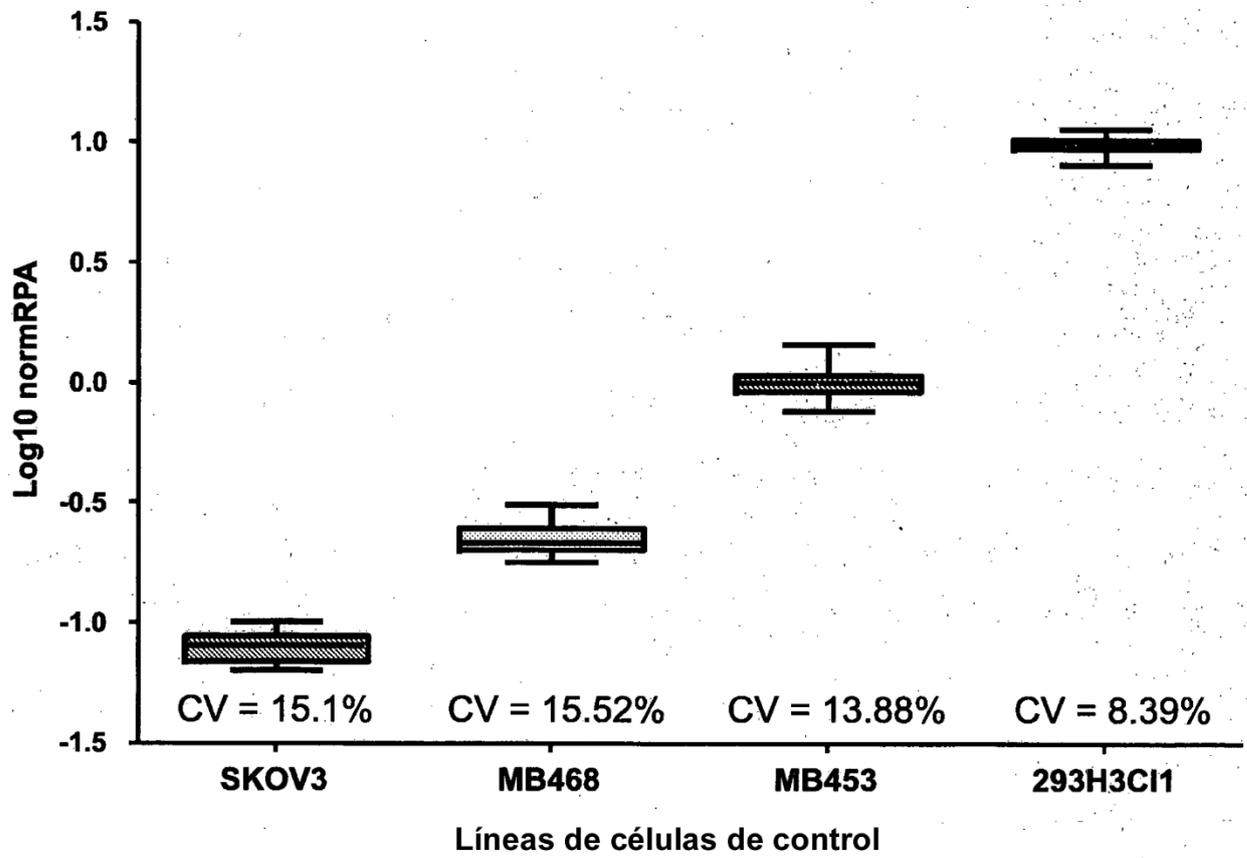
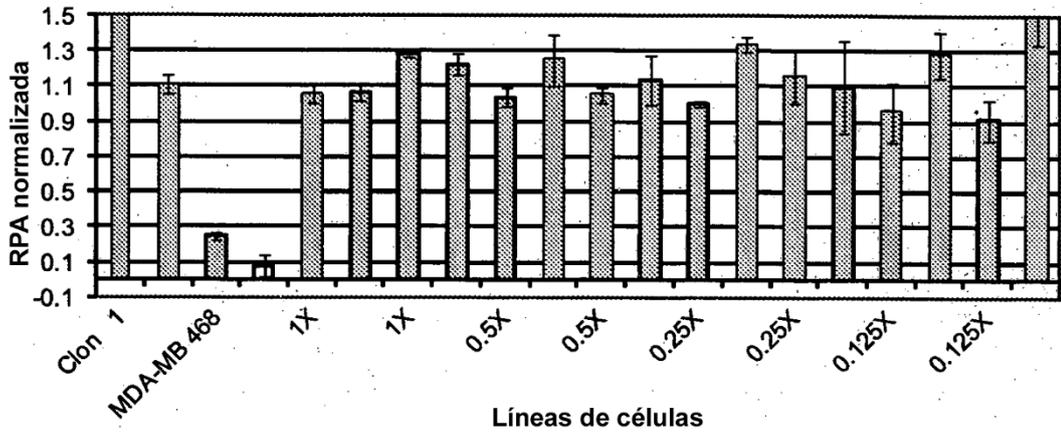


Figura 9

MDA-MB 453 Experimento "reducido"



MDA-MB 468 Experimento "reducido"

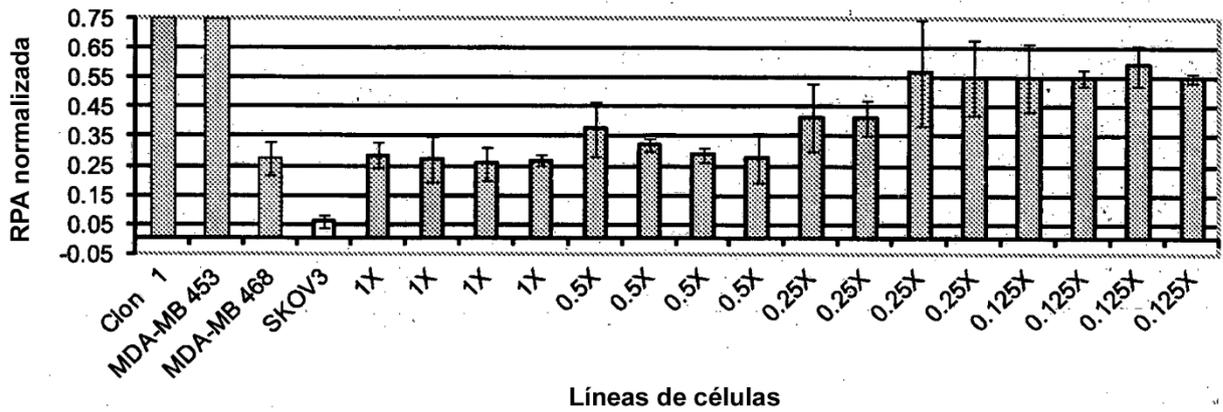


Figura 11

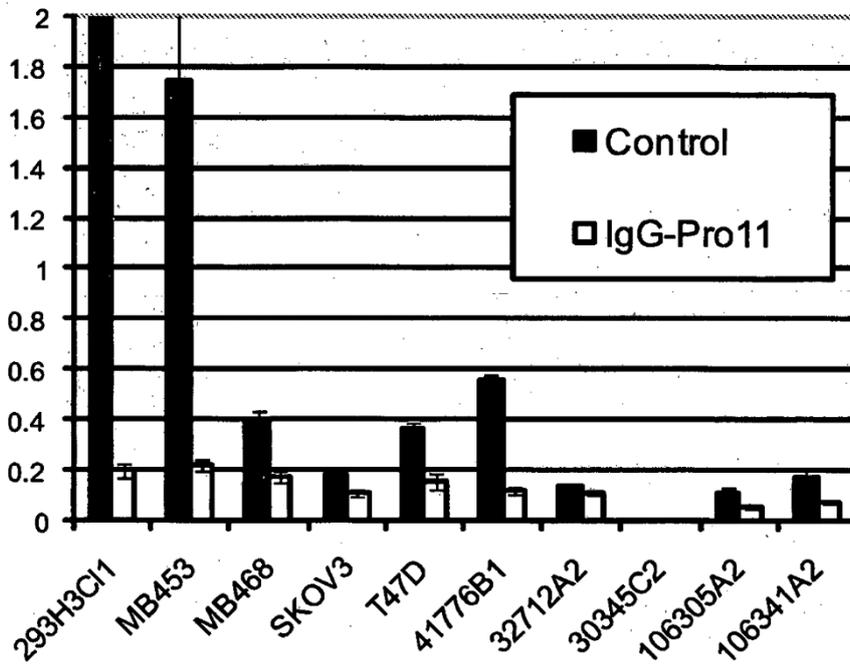
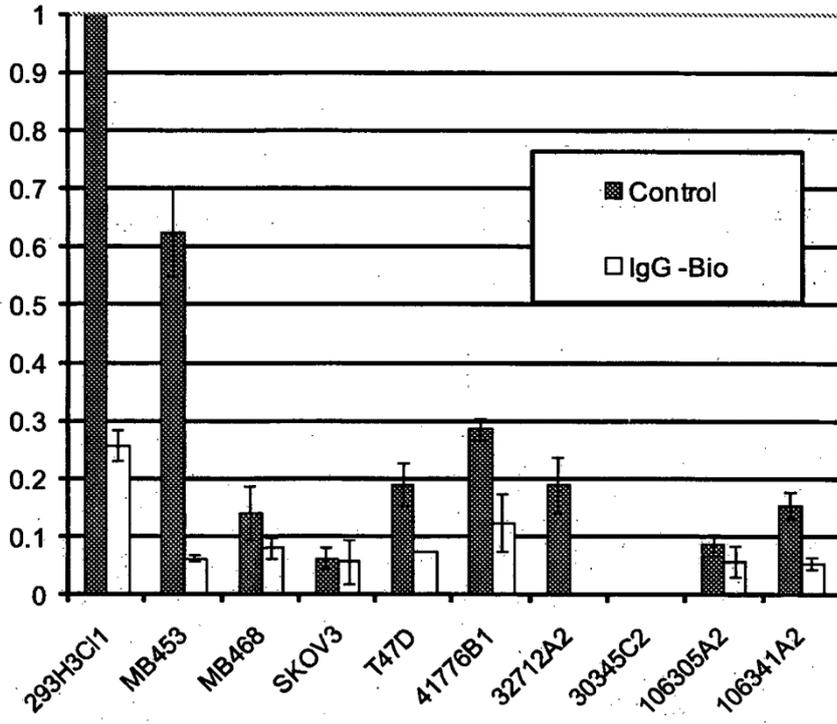


Figura 12

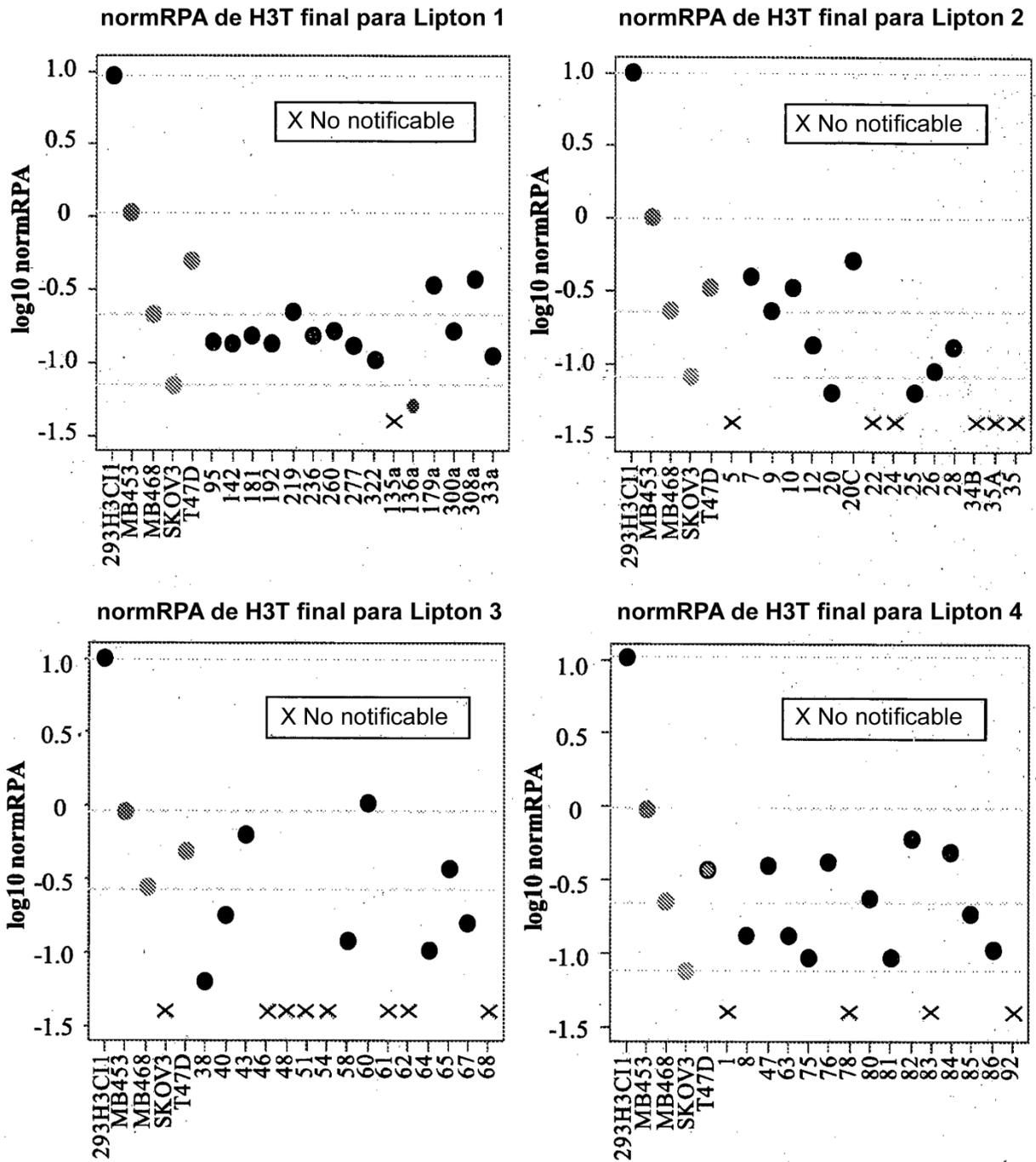
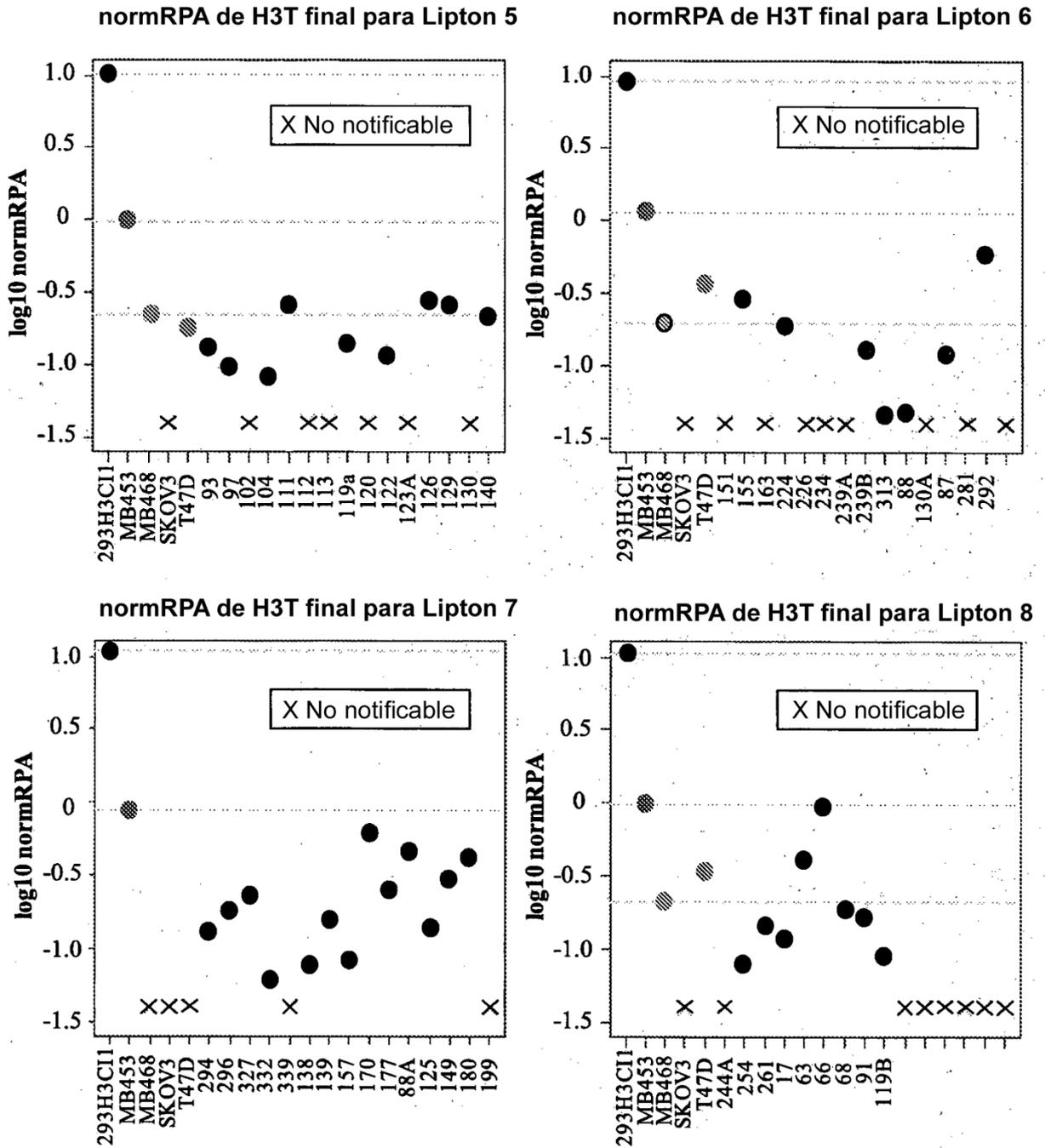


Figura 13

Figura 13 (Continuado)



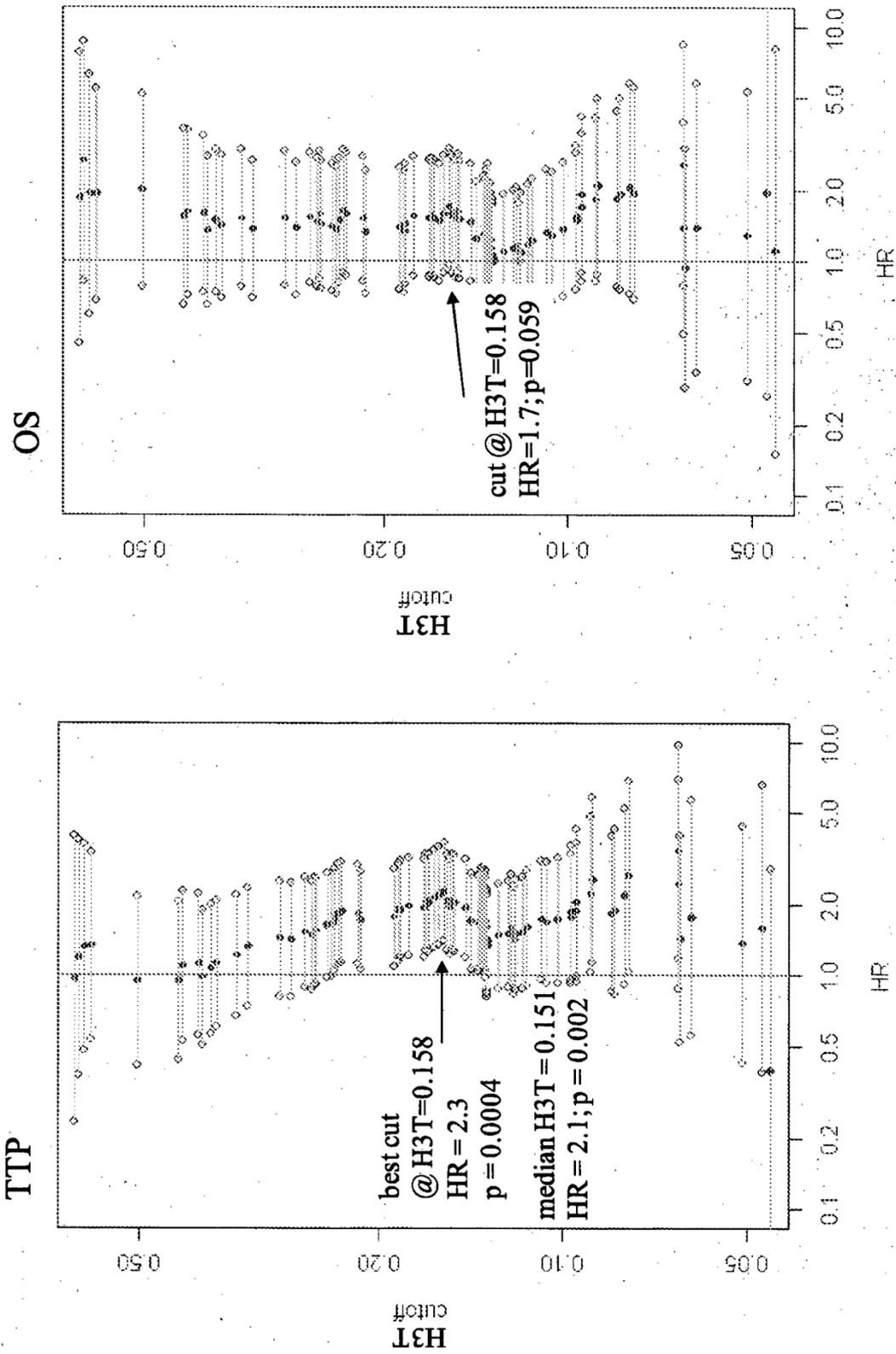


Figura 14

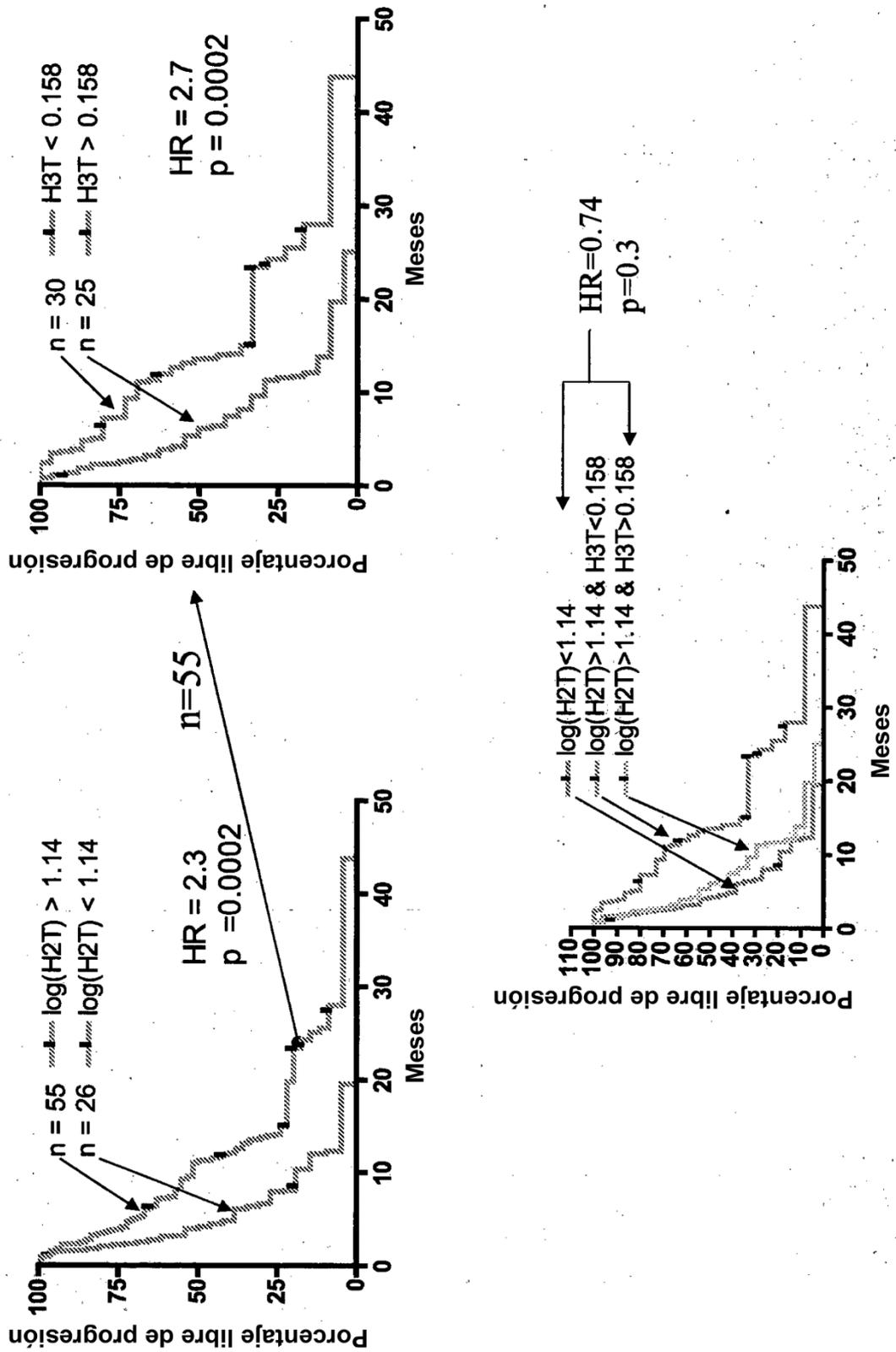


Figura 15

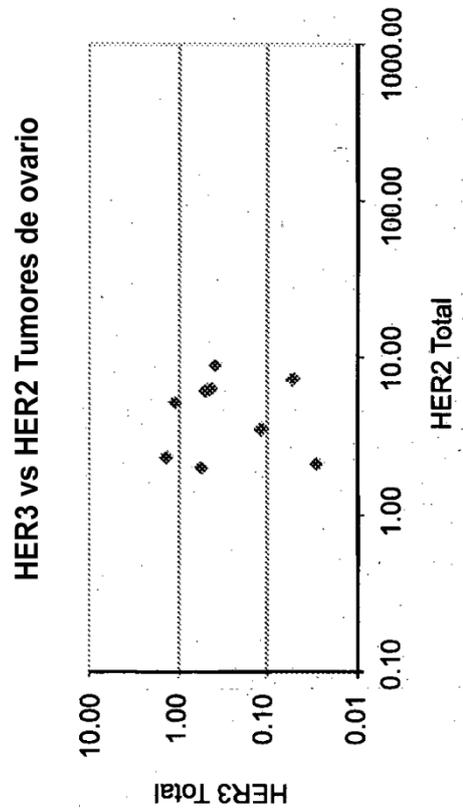
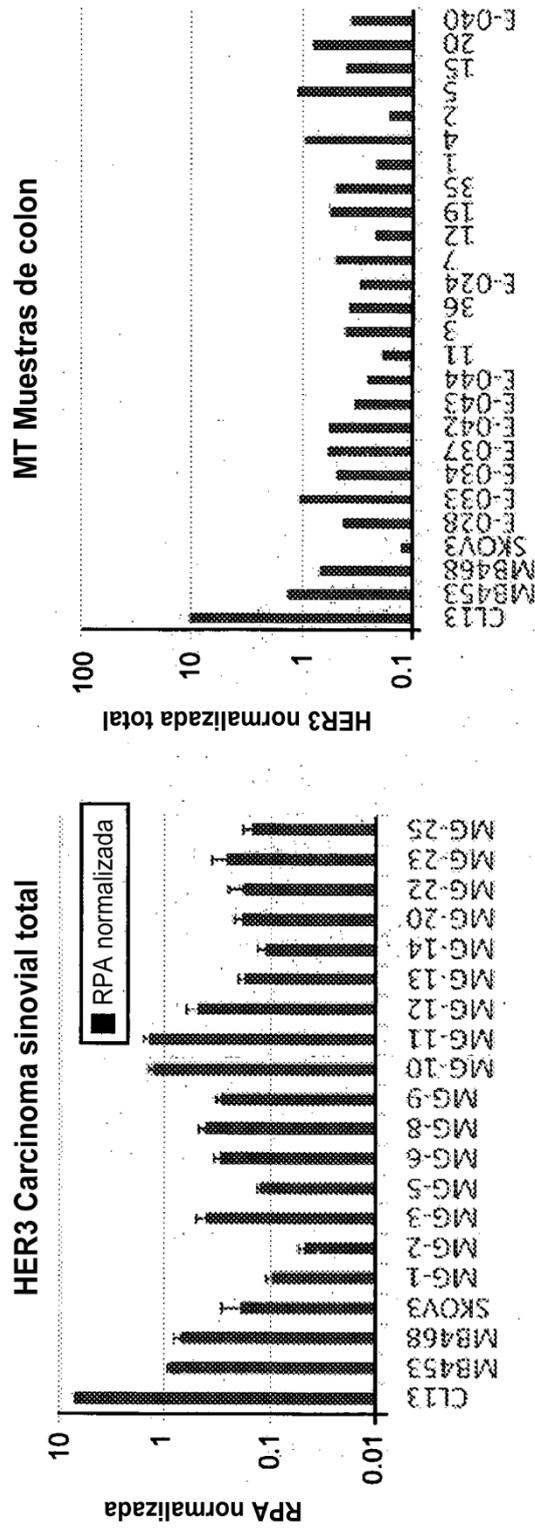


Figura 16

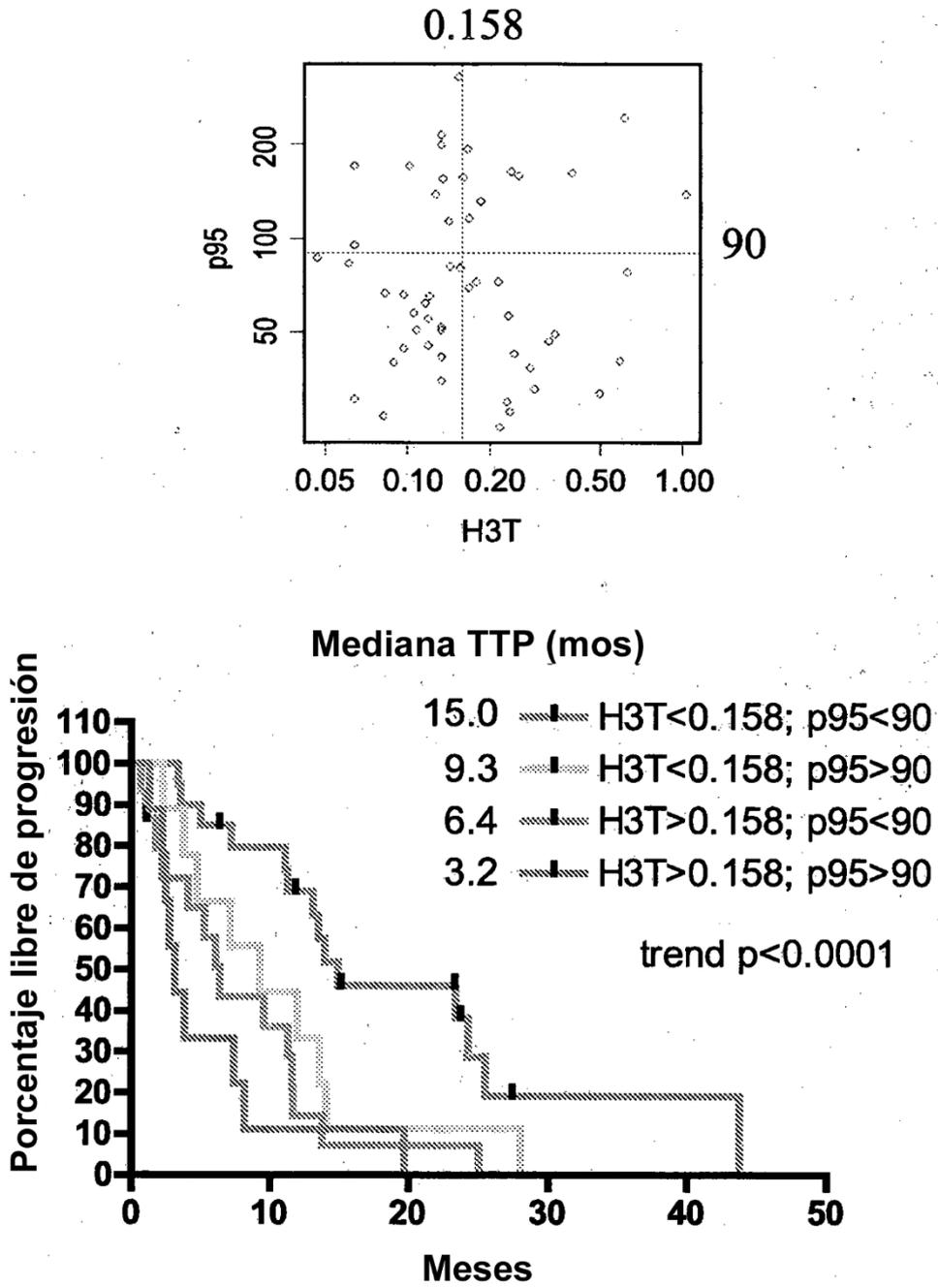


Figura 17

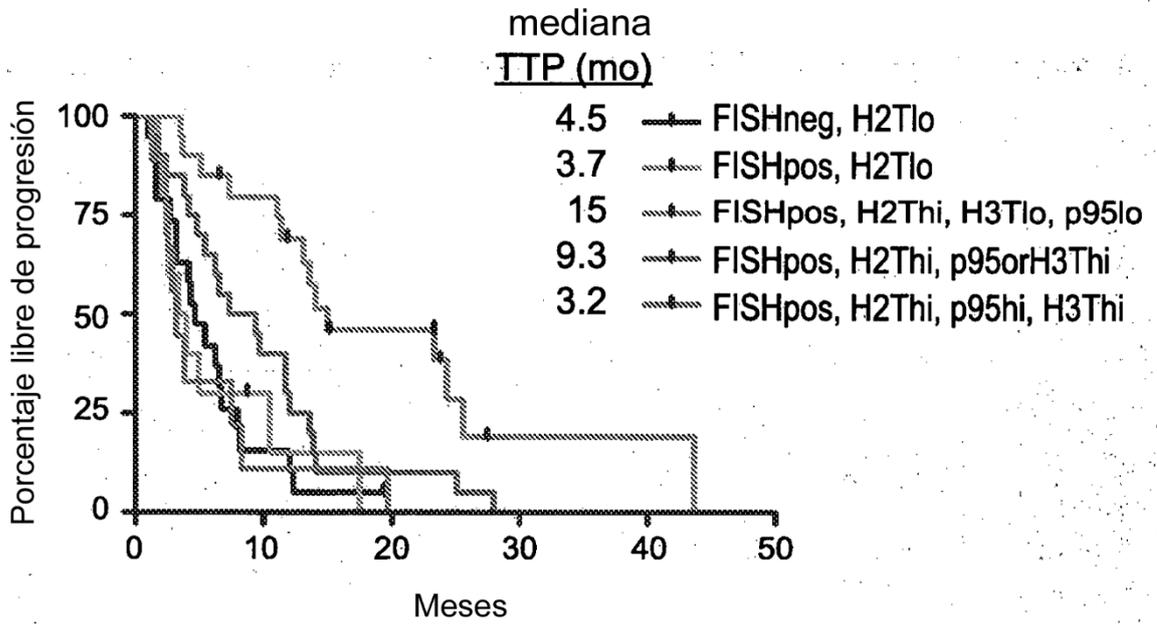


Figura 18