

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 411**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 33/53</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/32</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/48</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/74</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/574</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/68</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2009 PCT/US2009/066295**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10065568**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2009 E 09831007 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2438442**

54 Título: **Métodos y ensayos para medir p95 Y/O p95 en una muestra y anticuerpos específicos para p95**

30 Prioridad:

**01.12.2008 US 118975 P**  
**29.05.2009 US 182282 P**  
**17.06.2009 US 187960 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SPERINDE, JEFF;**  
**WINSLOW, JOHN, WILLIAM;**  
**JIN, XUEGUANG y**  
**WALLWEBER, GERALD J.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 637 411 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 y ensayos para medir p95 Y/O p95 en una muestra y anticuerpos específicos para p95

**Antecedentes de la invención**

5 Por lo general, un biomarcador es una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Véase Atkinson *et al.*, 2001, *Clin. Pharmacol. Ther.* 69:89-95. La naturaleza, facilidad de medición y correlación con estados fisiológicos de interés pueden variar en gran medida entre los distintos biomarcadores. Véase, *por ejemplo*, Frank *et al.*, 2003, *Nature Reviews Drug Discovery* 2:566-580. Por lo general se cree que el desarrollo de nuevos biomarcadores validados permitirá reducir significativamente los costes de la atención sanitaria y del desarrollo de fármacos, además de mejoras notables en el tratamiento de diversas enfermedades y patologías. Por tanto, se han dedicado grandes esfuerzos al uso de 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.

15 Las interacciones de los componentes de la membrana de la superficie celular juegan un papel fundamental en la transmisión de señales extracelulares a una célula en la fisiología normal y en los estados de enfermedad. En concreto, muchos tipos de receptores de la 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 la 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. El papel de estos eventos en enfermedades como el cáncer ha sido objeto de una intensa investigación y ha permitido el desarrollo de diversos fármacos nuevos y candidatos. 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.

30 Los niveles de expresión de los receptores individuales de la superficie celular, como Her-2 en el cáncer de mama, se han utilizado como biomarcadores, especialmente para determinar el pronóstico de un paciente o si este responderá o no a determinados tratamientos. Los análisis de inmunohistoquímica (IHC) convencional o hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) se han utilizado para detectar la sobreexpresión de Her-2 con el fin de determinar si el tratamiento con un agente que actúa sobre Her-2, por ejemplo trastuzumab, está garantizado. Lamentablemente, los análisis de IHC y FISH presentan determinadas limitaciones en tanto que herramientas de diagnóstico, puesto que no son necesariamente precisos y se prestan a diferentes interpretaciones por parte de los diferentes miembros del personal del laboratorio. También se observa una sobreexpresión de Her-2 en otros cánceres, tales como el cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de colon, cáncer de próstata y cáncer de páncreas. Véase Moseession *et al.*, 2004, *Semin. Cancer. Biol.* 14:262-270.

40 Un subgrupo de tumores con una sobreexpresión de Her-2 también presentan p95Her-2 (p95), una versión truncada N-terminal de Her-2 que se ha desprendido del ectodominio al que se une el trastuzumab. Los datos sugieren que la presencia de p95 está correlacionada con el grado de implicación de los nódulos linfáticos, lo que apunta a que p95 puede ser un factor de pronóstico importante para las metástasis del cáncer de mama. Véase Molina *et al.*, 2002, *Clin. Can. Res.* 8:347-353. Resulta interesante señalar que el trastuzumab se une a Her-2 pero no se puede unir a la versión truncada de p95 Her-2, por lo que el trastuzumab no resulta efectivo en pacientes con unos niveles de p95 elevados.

**Descripción breve de la invención**

El alcance de la presente invención viene definido por las reivindicaciones y toda la información no recogida en dichas reivindicaciones se aporta exclusivamente a título informativo.

50 En un primer aspecto, la invención es de anticuerpos y el uso de anticuerpos en métodos según las reivindicaciones. La invención incluye un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de p95 y/o un complejo de p95 en una muestra, donde el método comprende el suministro de una muestra y la determinación de la presencia y/o cantidad de p95 y/o complejo de p95 en la muestra utilizando el anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3. 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, una muestra congelada o un lisado. En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor.

60 En una realización preferible, la muestra es una muestra de tejido tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende

líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico.

5 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o la cantidad de p95 y/o de un complejo de p95 en una muestra, donde el método consiste en mezclar una muestra con un compuesto de unión y determinar la presencia y/o cantidad de compuesto de unión unido a p95 y/o al complejo de p95 según las reivindicaciones. En una realización, el compuesto de unión es capaz de unirse específicamente a p95. En una realización preferible, el compuesto de unión comprende un anticuerpo. En una realización de la divulgación, el anticuerpo se presenta ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7.

10 MPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIIS SEC. ID. N.º 1  
ASPLTSIISSEC. ID. N.º 2  
PAEQRASPLTSIISSEC. ID. N.º 3  
QPCPINCTHSCVDLDDKGCPASEC. ID. N.º 4  
MPIWKFPDEEGACSEC. ID. N.º 5

15 PSGVKPDLSPYMPIWKSEC. ID. N.º 6  
Ac-QPCPINCTHSCVDLDDKGCPAKK(sNH)-[KLH]SEC. ID. N.º 6

20 En determinadas realizaciones, el anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama.

25 En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico.

30 En una realización preferible, la determinación de la presencia y/o cantidad de compuesto de unión unido a p95 comprende asimismo el suministro de un segundo compuesto de unión, donde el segundo compuesto de unión es capaz de unirse específicamente al compuesto de unión unido a p95 y la determinación de la presencia y/o cantidad del segundo compuesto de unión como correlativa con la presencia y/o cantidad del compuesto de unión unido a p95. En una realización preferible, el segundo compuesto de unión es un anticuerpo.

35

40 En un tercer aspecto, la divulgación describe un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de p95 y/o un complejo de p95 en una muestra, donde el método consiste en lo siguiente: mezclar (i) una muestra que puede contener p95 y/o un complejo de p95; (ii) una sonda de proximidad que es capaz de unirse a p95 y/o al menos otro analito de un complejo de p95, donde la sonda de proximidad tiene una proximidad efectiva; y (iii) al menos un compuesto de unión, donde ese compuesto de unión es capaz de unirse a p95 y/o al menos otro analito y que tiene 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 está correlacionada con la presencia y/o cantidad de p95 y/o del complejo de p95. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión son capaces de unirse específicamente a p95 y/o al otro analito. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprenden también un anticuerpo. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprenden además un anticuerpo, y cada anticuerpo se une a un epítipo específico de p95. En una realización preferible de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-6.

50

En determinadas realizaciones, el anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1.

55 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, de forma directa o indirecta, mediante hibridación. La hibridación se puede cuantificar a través de cualquier método conocido por un experto en la técnica, como por ejemplo a través de la medición de las etiquetas moleculares unidas a las moléculas de ácido nucleico o la medición de la hibridación por cualquier método conocido por un experto en la técnica. En una realización

60

preferible, la hibridación se mide a través de un método de amplificación de ácido nucleico, como por ejemplo el método de amplificación por círculo rodante. En una realización preferible de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización preferible, el anticuerpo es p95.D9. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico.

En una realización preferible, la sonda de proximidad comprende una sonda de clivaje que tiene una fracción inductora del clivaje y donde el compuesto de unión tiene una o más etiquetas moleculares unidas al compuesto de unión a través de un ligamiento clivable, donde el ligamiento clivable puede ser clivado dentro de la proximidad efectiva produciendo una señal que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de p95 y/o del complejo de p95. En una realización preferible, el compuesto de unión y/o la sonda de clivaje comprenden también un anticuerpo y cada anticuerpo se une a un epítipo específico de p95 y al menos a otro analito de un complejo de p95. En una realización preferible de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición es cuantitativa en un amplio rango dinámico.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo purificado que se une a p95 según las reivindicaciones 1 a 3. El anticuerpo purificado se une específicamente a p95. El anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de p95 pero no a HER2 de longitud completa. 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 de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. El anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1.

En un quinto aspecto, la divulgación describe un método para determinar si es probable que un sujeto que padece un cáncer responda al tratamiento con una terapia dirigida, para predecir la evolución de la enfermedad y/o para predecir la probabilidad de un evento significativo en la evolución del cáncer del sujeto en base a la medición de una cantidad de p95 y/o de un complejo de p95 en una muestra según las reivindicaciones. En una realización, la invención se refiere a un método para determinar si es probable que un sujeto que padece un cáncer responda al tratamiento con un agente que actúa sobre Her-2 utilizando el anticuerpo de las reivindicaciones 1 a 3. En otra realización de la divulgación, la invención se refiere a un método para predecir la evolución de una enfermedad en un sujeto con cáncer. En otra realización de la divulgación, la invención se refiere a un método para predecir la probabilidad de un evento significativo en un sujeto con cáncer.

En una realización preferible de la divulgación, la evolución se mide determinando el tiempo transcurrido entre eventos significativos en el transcurso de la enfermedad de un paciente, donde la medición es predictiva de si un paciente tendrá una evolución prolongada. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la muerte. En una realización preferible, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la enfermedad metastásica. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la recidiva. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la cirugía hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la cirugía hasta la metástasis. En una realización preferible de la

divulgación, el evento significativo es la progresión de la cirugía hasta la recidiva. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la enfermedad metastásica hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la recidiva. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la enfermedad metastásica hasta la recidiva. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la recidiva hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, la evolución se mide con respecto a la tasa de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o el uso de RECIST.

En una realización preferible, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama. En una realización preferible, la terapia dirigida comprende un agente que actúa sobre Her-2. En una realización preferible, el agente que actúa sobre Her-2 es trastuzumab y/o pertuzumab. En una realización preferible, el agente que actúa sobre Her-2 es un inhibidor de la tirosina quinasa y si la cantidad de p95 es elevada, entonces es probable que el paciente responda a la terapia dirigida, es probable que el paciente presente una evolución prolongada y/o es poco probable que el paciente padezca un evento significativo. En una realización preferible, el agente que actúa sobre Her-2 es lapatinib. En una realización preferible, la terapia dirigida es un inhibidor, como un inhibidor de la proteasa, y si la cantidad de p95 es elevada, entonces es probable que el paciente responda a la terapia dirigida, es probable que el paciente presente una evolución prolongada y/o es poco probable que el paciente padezca un evento significativo. En una realización preferible, el inhibidor inhibe las metaloproteasas incluyendo, entre otras, las metaloproteasas de matriz y/o miembro(s) de la familia ADAM de proteasas. En una realización preferible, el inhibidor inhibe ADAM 10.

En una realización preferible de la divulgación, para determinar si la cantidad de P95 es baja se compara la cantidad de p95 en el cáncer del sujeto con un límite óptimo.

Estos límites óptimos se divulgan en el presente y determinadas realizaciones de la divulgación pretenden incluir cantidades que son aproximadas a las cantidades mencionadas y divulgadas en el presente. En determinadas realizaciones la cantidad de P95 en el sujeto se compara con un límite óptimo y el límite óptimo se utiliza para determinar si un paciente responderá a un tratamiento apropiado.

En otro aspecto de la divulgación, se proporcionan métodos para tratar a un sujeto con cáncer. En un aspecto, los métodos consisten en determinar que el sujeto padece un cáncer que es probable que responda al tratamiento y/o tenga una evolución prolongada según un método de la invención, y en administrar una cantidad efectiva del compuesto al sujeto como resultado de dicha determinación. En otro aspecto, los métodos consisten en determinar que un sujeto que padece un cáncer es probable que responda al tratamiento según un método de la invención y, a continuación, en recomendar a un profesional médico la opción de tratamiento consistente en administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente. En otro aspecto, el agente es al menos dos agentes y se recomiendan al profesional médico las opciones de tratamiento en función de los métodos de la invención.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra datos del ensayo ELISA de los anticuerpos generados contra un péptido p95 (mostrado como SEC. ID. N.º 5). Los medios acondicionados de clones de hibridomas individuales (D1-D13, enumerados en la columna 1) se sometieron a ensayos ELISA contra el péptido p95 utilizado para inmunizar al ratón del que se obtuvieron los hibridomas (etiquetados Her2-D pep, mostrados en la columna 2), el dominio extracelular de HER2 (HER2-ECD, etiquetados Her2-hFc, mostrados en la columna 3) y un péptido diferente del utilizado en la inmunización (etiquetado Her2-A pep, mostrado en la columna 4). También se muestran los controles positivos para el péptido HER2-ECD y Her2-A. Las células destacadas en la tabla muestran una reactividad positiva en el ensayo ELISA. Varios clones muestran reactividad al péptido p95 utilizado para la inmunización pero escasa reactividad con HER2-ECD 5 (clones D3, D5, D7-11 y D13). Otros muestran reactividad tanto al péptido p95 como a HER2-ECD (clones D4, D6, y D12).

La Figura 2 muestra un screening por inmunoblot de medios acondicionados de hibridomas. Se separaron 5 ug de lisado celular de células 293T (línea 3) y células SKBR3 (línea 2) y 1 ug de lisado celular de células 293T transfectadas con pcDNA6-p95 (un vector de expresión para p95, línea 1) en geles NuPAGE al 4-12% (Invitrogen). Los geles se colocaron en membranas PVDF cubiertas de medios acondicionados de hibridomas D4, D8, D12 o Her2 Ab8. Her2 Ab8 (Labvision, Fremont, CA) se utilizó como anticuerpo de control positivo y se une a un epítipo intracelular de Her2 que también forma parte de pcDNA6-p95. Los anticuerpos unidos se detectaron con un antisuero anti-IgG murina conjugado con peroxidasa de rábano y un reactivo ECL.

Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados de clasificación de las células activadas por fluorescencia (FACS) tanto de las células nativas (Figura 3a) como de las células permeabilizadas y fijadas (Figura 3b). Cada panel muestra los resultados de las células transfectadas 293T unidas a los medios acondicionados de diferentes clones (D4, D8, D9 y D12 en las filas superiores de cada figura; D3, D7, D10 y D11 en las filas inferiores). El anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo anti-murino biotinilado seguido de estreptavidina-PE. Los dos paneles de la izquierda muestran las células 293T transfectadas con pcDNA6-HER2, que expresa toda la longitud de la proteína de HER2; los dos paneles del centro muestran las

células 293T transfectadas con pcDNA6myc/hisA M61 I-p95, que expresa p95. Las proteínas de expresión de HER2 y p95 tienen una etiqueta de hemaglutinina N-terminal. Los dos paneles de la derecha muestran las células 293T transfectadas con un vector que expresa una proteína irrelevante. Cada panel también muestra un control positivo (HA.A28.2, un anticuerpo dirigido a las etiquetas de hemaglutinina N-terminales de las proteínas de p95 y HER2 expresadas) y un control negativo (un anticuerpo anti-ricina). El eje y es un histograma que muestra el número de eventos a un determinado nivel de señal PE en el eje x. Las características de unión de las células nativas respecto de las fijadas fueron similares (salvo por D11), lo que sugiere que las muestras fijadas con formalina e introducidas en parafina (FFPE) pueden mostrar características de unión similares. Entre los anticuerpos que se unieron con fuerza a p95 y con debilidad a HER2 se incluyeron los clones D4, D8, D9 y D12. Entre los anticuerpos que se unieron con fuerza a p95 pero no a HER2 se incluyeron los clones D3, D7, D10 y D11.

La Figura 4 muestra los datos del inmunoblot para las células utilizadas posteriormente para crear bloques fijados en formalina e introducidos en parafina (FFPE). Se prepararon lisados celulares a partir de las muestras extraídas justo antes de añadir el fijador. Las proteínas de estos lisados celulares se separaron utilizando PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon, se sometieron a una sonda con Ab8 anti-HER2 y se detectaron utilizando un kit de detección de peroxidasa de rábano. Las líneas 1-4 muestran lisados celulares de MCF-7-HER2c, MCF-7-p95c, SKBR3-p95c y SKBR3-p95c2, respectivamente. Estas células se obtuvieron del laboratorio de Jose Baselga; expresan proteínas que no contienen ninguna secuencia líder ni HA-tag. Las líneas 5-8 muestran lisados de células MCF-7 (línea 5) y células MCF-7 transfectadas transitoriamente con una mezcla 50:50 en peso de pcDNA6-HER2 y vector vacío (línea 6), una mezcla 50:50 en peso de pcDNA6-HER2 y pcDNA6myc/hisA M61 I-p95 (línea 7) o 100% pcDNA6myc/hisA M61 I-p95 (línea 8). La línea 9 muestra el lisado celular de células SKBR3.

La Figura 5 muestra el flujo de trabajo y la configuración de ensayo de un ensayo VeraTag de p95 con muestras FFPE. La sección superior izquierda de la figura muestra el flujo de trabajo para el ensayo VeraTag. Un portaobjetos que contiene la muestra de interés se desparafina y rehidrata; a continuación se bloquea y se añade el anticuerpo p95. Se añade un segundo anticuerpo etiquetado con VeraTag (es decir, "secundario anti-ratón") que se une al primer anticuerpo, como se muestra en la parte derecha de la Figura a. La muestra se aclara y se libera el VeraTag, se captura y mide utilizando electroforesis capilar (CE). El panel inferior de la Figura 5a muestra un electroferograma CE típico.

Se utiliza el software patentado (VeraTag Informar Software) para evaluar los electroferogramas en bruto. El software integra picos fluorescentes asociados con la etiqueta liberada así como una fluoresceína estándar interna de concentración conocida, utilizada para la normalización capilar con el fin de obtener un área relativa pico (área pico de VeraTag frente al área pico de fluoresceína). Por otra parte, un patólogo valora el área del tumor revelada por la tinción con eosina y hematoxilina. El área relativa pico se divide por esta área del tumor para obtener el valor final.

La reproducibilidad del ensayo indicada en la Figura 5a se muestra en la Figura 5b utilizando tres tipos de comparaciones. El panel superior izquierdo muestra una comparación de los datos de ensayo acumulados de 19 muestras de tumores en un día (eje x, 8/19 niveles de p95) frente a un segundo conjunto de datos de las mismas muestras obtenidos al día siguiente (eje y, 8/22 niveles de p95). El panel superior derecho muestra el análisis de un conjunto de 12 muestras de tumores realizados en tres días diferentes (eje y, niveles de p95) frente al nivel de p95 medio (eje x). El panel inferior de la Figura 5b muestra los datos combinados para todos los conjuntos experimentales (eje y, niveles de p95) frente al nivel medio de p95 (eje x, niveles de p95). En cada panel, la línea diagonal representa la correlación perfecta entre los datos del eje x y los datos del eje y, que se expresa como un área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{L por cm}^2$  (RPA\* $\mu\text{L/sqcm}$ ).

La coherencia entre operadores y en el transcurso del tiempo resulta crítica para los ensayos estandarizados.

La Figura 5c muestra cómo se ha conseguido la coherencia entre lotes utilizando líneas celulares con cantidades muy diversas de p95 como parámetros de normalización. En cada uno de los tres primeros paneles superiores, etiquetados como "PRE-normalización", se muestran las comparaciones por pares entre tres operadores. En cada caso, las unidades de p95 se muestran como áreas pico relativas multiplicadas por  $\mu\text{L por cm}^2$  (RPA\*  $\mu\text{L/sqcm}$ ). En el panel superior derecho, las mismas puntuaciones de dos operadores se comparan gráficamente con las puntuaciones conseguidas por un tercer operador tras la normalización según parámetros internos. El proceso para la normalización se describe en el Ejemplo 4. El panel inferior muestra el coeficiente de variabilidad (CV, eje y) entre ambos lotes/operadores en un amplio rango de niveles de p95 (niveles medios de p95 trazados en el eje x).

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo VeraTag utilizando diferentes anticuerpos purificados contra células MCF-7 y SKBR3 transfectadas con un fragmento C-terminal (CTF) de HER2, p95 o HER2 de longitud completa. Los CTF de HER2, que se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo, se generan mediante una iniciación de la traducción alternativa desde las metioninas ubicadas cerca del dominio transmembrana de la molécula de longitud completa. Como HER2 y p95, los tumores dependientes de CTF son sensibles a inhibidores de la quinasa y como los tumores dependientes de p95, no responden a anticuerpos terapéuticos contra HER2. Los anticuerpos utilizados en el ensayo VeraTag

se generaron utilizando un péptido (SEC. ID. N.º 5) de p95. Cada anticuerpo purificado (D4.1, D7.2, D8.2, D9.1, D10.1 y D12.1 como se muestra en el eje x) se sometió a ensayo con seis líneas celulares (enumeradas de arriba a abajo en la leyenda y desplegadas de izquierda a derecha en cada gráfico de barras): MCF-7, MCF-7 con expresión de CTF, MCF-7 con expresión de HER2, MCF-7 con expresión de p95, SKBR3 y SKBR3 con expresión de CTF. El eje x se muestra en el área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (RPA\* $\mu\text{L}/\text{sqcm}$ ), tal y como se expone en el Ejemplo 4. El anticuerpo A3.1, que se generó estimulando a los ratones con un péptido irrelevante. El control positivo fue Ab8, que está dirigido al dominio citoplásmico de HER2. Tanto D4.1 como D12.1 actúan en gran medida como el anticuerpo de control.

10 D8.2 y D9.1 muestran especificidad por p95.

La Figura 7 muestra la cuantificación de p95 en 12 muestras tumorales diferentes (Cohorte A). Las 12 muestras tumorales se seleccionaron por presentar unos niveles de HER2-positivos muy elevados y de pacientes nódulo positivos. La mitad de cada una de las muestras tumorales se congelaron en fresco y la otra mitad se fijaron con formalina y se introdujeron en parafina. Las muestras congeladas en fresco se utilizaron para generar lisados celulares que se sometieron a ensayos inmunoblot para determinar la capacidad de unirse a un anticuerpo, CB11, dirigido contra el dominio intracelular de HER2. Los resultados del inmunoblot se muestran en la Figura 7a. Las 12 muestras tumorales se etiquetaron con los números 1 a 12 de izquierda a derecha. Hay una línea de separación entre las muestras 7 y 8. El lisado de células SKBR3 se utilizó como control positivo (línea derecha). La presencia de cantidades significativas de p95 se observa en las muestras 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 10; estos tumores se designaron p95-positivos.

Los portaobjetos FFPE de los 12 tumores, junto con siete patrones celulares, se sometieron al ensayo VeraTag que se recoge en la Figura 5, utilizando el clon D9.1, que se ha demostrado que es p95-específico (véase la Figura 6). Los resultados del ensayo de las muestras FFPE de clones designadas por inmunoblot utilizando muestras congeladas en fresco como p95-positivas o p-95 negativas se muestran en la Figura 7b. El eje x muestra los resultados p95-positivos o negativos por inmunoblot, el eje y muestra el área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ , como se recoge en el Ejemplo 4. Estos resultados se han trazado de nuevo para mostrar los resultados de clones individuales en la Figura 7c, junto a los resultados de los siete patrones celulares. Los clones positivos según el inmunoblot 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 10 se muestran a la izquierda, seguidos de los clones negativos según el inmunoblot 4, 6, 9, 11 y 12, seguidos de los patrones celulares, que son los siguientes: MCF-7, MCF-7-p95, MCF-7-CTF, MCF-7-HER2, SKBR3, SKBR3-CTF y MDA-MB-453. El eje x muestra los niveles de p95 en unidades de área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (RPA\* $\mu\text{L}/\text{sqcm}$ ), tal y como se expone en el Ejemplo 4. Especialmente teniendo en cuenta la probable heterogeneidad entre las células congeladas en fresco utilizadas para el inmunoblot y las muestras FFPE utilizadas para el ensayo, existe una clara correlación entre los dos métodos de cuantificación de p95.

La Figura 8 demuestra la especificidad del anticuerpo D9.1 en comparación con el control de su isotipo. Los anticuerpos de control de isotipo se utilizan para demostrar la unión no específica de anticuerpos primarios diana a los antígenos de la superficie celular. El anticuerpo de control de isotipo utilizado en este experimento es IgG2a, que corresponde al isotipo de D9.1. El ensayo descrito en la Figura 5 se utilizó para testar las muestras tumorales FFPE tanto positivas como negativas según el inmunoblot, junto con seis patrones celulares. En la Figura 8a, los clones positivos según el inmunoblot 1, 2, 3, 5, 7, 8 y 10 se muestran a la izquierda, seguidos de los clones negativos según el inmunoblot 4, 6, 9, 11 y 12, seguidos de los patrones celulares, que son los siguientes: MCF-7, MCF-7-p95, MCF-7-CTF, MCF-7-HER2, SKBR3 y SKBR3-CTF. En cada muestra, la unión al anticuerpo monoclonal D9.1 se muestra a la izquierda y la unión al anticuerpo de control de isotipo, IgG2a, a la derecha. El eje x muestra los niveles de p95 en área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (RPA\* $\mu\text{L}/\text{sqcm}$ ), tal y como se expone en el Ejemplo 4. En la Figura 8b (panel inferior izquierdo), se muestran los resultados para las muestras negativas y positivas según el inmunoblot antes de sustraer la unión no específica; en la Figura 8c (panel inferior derecho), se muestran los resultados para las muestras negativas y positivas según el inmunoblot después de sustraer la unión no específica al isotipo. El eje x muestra los resultados p95-positivos o negativos por inmunoblot; el eje y muestra los niveles de p95 en área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  (RPA\* $\mu\text{L}/\text{sqcm}$ ), como se recoge en el Ejemplo 4. La diferencia en las medias entre los clones p95-positivos y p95-negativos es aproximadamente de 4x con un rango dinámico aproximado de 10x.

La Figura 9 recoge datos que demuestran que los tumores p95-positivos tienen más probabilidades de ser claramente HER2-positivos, tal y como muestra el ensayo VeraTag de HER2-total (H2T). Las muestras tumorales descritas en las Figuras 7 y 8 se testaron en el ensayo H2T (Cohorte A). Los datos se muestran en la Figura 9a. Los tumores se distribuyeron por todo el rango de HER2-positividad, aunque la puntuación media de las muestras consideradas p95-positivas por los datos del inmunoblot fue notablemente superior que la de las p95-negativas (véase, el ensayo de Mann-Whitney recogido en Conover, W.J. (1980), Practical Nonparametric statistics(3<sup>rd</sup> Ed.)).

Un segundo conjunto de 18 muestras tumorales FFPE (Cohorte B, diamantes) se testó utilizando tanto el ensayo de p95 como el ensayo de H2T. La Figura 9b muestra los resultados correlativos. La Cohorte B (cuadrados) corresponde al conjunto de tumores medidos en la Figura 7c. El límite aproximado para la

positividad determinada por inmunoblot obtenido de la Figura 7b se indica mediante una flecha en el eje y en la Figura 9b.

Por lo general, una señal de p95 más alta es más probable que esté asociada con una señal de H2T alta en ambas cohortes.

5 Una amplia cohorte de pacientes tratados con trastuzumab cuyos tumores habían sido testados previamente para H2T fueron investigados para determinar si existía alguna correlación entre los malos resultados y las muestras en el rango de HER2 elevado teóricamente enriquecido para p95. Esta cohorte se obtuvo del grupo de estudio Serum Her2/neu Study Group (ISHSG) y se conoce como cohorte Lipton. Estos pacientes fueron seleccionados inicialmente mediante IHC realizada en un establecimiento central  
10 (la Universidad de Viena, Austria) por un único patólogo. El 90% de los pacientes eran IHC3+, y 80/92 recibieron trastuzumab en combinación con quimioterapia, mientras que 12 recibieron trastuzumab como único fármaco. 88/92 padecían cáncer de mama metastásico y podrían haber recibido trastuzumab como terapia de primera, segunda o tercera línea. Para el rango de HER2 alto, se estableció un valor límite de  $\log_2(\text{H2T}) > 1,95$ , justo por encima de la muestra p95-negativa más alta (el límite se muestra en la Figura 9a). Por encima de este límite de H2T, los tumores se podrían describir como p95-enriquecidos, mientras que por debajo del límite serían p95-equívocos. Entre los pacientes confirmados como HER2-FISH-positivos, los del grupo p95-enriquecidos presentaban un tiempo hasta la progresión notablemente más corto (mostrado en la Figura 9c) y una supervivencia global (mostrada en la Figura 9d) significativamente menor que los del grupo de tumores p95-equívocos.

20 La Figura 10 muestra la inmunohistoquímica (IHC) colorimétrica de líneas celulares FFPE y muestras de tumores positivas o negativas para p95. En la Figura 10a, se muestran los datos del ensayo (panel superior) de los niveles de p95 (expresados en RPA\* $\mu\text{L}/\text{sqcm}$ ) y los datos de la IHC (panel inferior) de las líneas celulares FFPE sometidas a una sonda con D9.1. Las líneas celulares mostradas son MCF7, MCF7 transfectadas con p95 o Her2 de longitud completa, SKBR3 y SKBR3 transfectadas con CTF, el fragmento C-terminal de HER2 que se encuentran tanto en el núcleo como en el citoplasma. Se sabe que MCF7 expresa bajos niveles de Her2, mientras que la línea de células madre SKBR3 se sabe que expresa altas cantidades de HER2 de longitud total y bajos niveles de p95. Las células MCF7 y SKBR3 teñidas con D9.1 muestran escasa tinción, coherente con el bajo nivel de p95. Las células MCF7-p95 teñidas con D9.1 muestran tinción localizada principalmente en la membrana celular, coherente con la ubicación del p95.

30 El anticuerpo del isotipo de control IgG2a no mostró ninguna tinción en la membrana celular, lo que demuestra la especificidad del anticuerpo D9 (datos no mostrados). Los resultados de la IHC son coherentes con los resultados observados utilizando el ensayo VeraTag.

La Figura 10b muestra los datos tanto del ensayo como de la IHC para las muestras tumorales FFPE. En el panel izquierdo, los datos del ensayo de p95 se muestran para tres muestras tumorales (n.º 5, 6 y 12), así como dos líneas celulares (MCF7 y MCF7 transfectadas con p95). Las unidades para los niveles de p95 se expresan como RPA\* $\mu\text{L}/\text{sqcm}$ . En el panel derecho, los datos de la IHC se muestran para las muestras FFPE sometidas a una sonda con D9.1, un anticuerpo específico para p95 (paneles superiores) o CB11, un anticuerpo dirigido al dominio intracelular de HER2 (paneles inferiores). Los tres tumores muestran tinción con el anticuerpo CB11, coherente con la presencia de HER2 de longitud completa, mientras que solamente el tumor 5, para el que tanto el inmunoblot como el ensayo VeraTag demostraron que era p95-positivo, se tiñe con D9.1. Estos datos sugieren también que el epítipo reconocido por el anticuerpo D9.1 se encuentra en formas naturalmente presentes de p95 en el tejido del cáncer de mama.

45 La Figura 11 muestra los resultados de estudios de cuantificación de p95 utilizando anticuerpos anti-p95 etiquetados directamente con etiquetas moleculares. El experimento se realizó como se explica en la Figura 5, salvo por el hecho de que los anticuerpos fueron etiquetados directamente con etiquetas moleculares en lugar de utilizando un anticuerpo anti-murino secundario. Los anticuerpos monoclonales purificados utilizados en estos estudios fueron D4.1, D8.2, D9.1 y D12.1 como se muestra en el eje x; el eje y recoge el área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , tal y como se recoge en el Ejemplo 4. El anticuerpo anti-HER2 Ab8 se utilizó como control positivo. Las líneas celulares testadas fueron, de arriba a abajo en la leyenda y de izquierda a derecha en el gráfico de barras, MCF-7, MCF-7-CTF, MCF-7-her2, MCF-7-p95, SKBR3 y SKBR3-CTF. Los resultados mostrados son muy similares a los que se observan en la Figura 6, salvo por una reducción del rango dinámico entre las líneas celulares que expresan altos niveles de p95 (MCF-7-CTF, MCF-7-p95 y SKBR3-CTF) y las líneas celulares que expresan bajos niveles de p95 (MCF-7, MCF-7-Her2 y SKBR3).

55 La Figura 12 muestra dos conjuntos de resultados utilizando el anticuerpo D9.1 para medir los niveles de p95 en parámetros de líneas celulares y tumores, de izquierda a derecha, respectivamente. En las Figuras 12a y 12b, D9.1 se etiqueta con VeraTag para cuantificar p95 en parámetros de líneas celulares (Figura 12a) y muestras tumorales de la Cohorte A (Figura 12b) utilizando un ensayo de un único anticuerpo. Los parámetros de líneas celulares testados son, de izquierda a derecha en el eje x mostrado en la Figura 12a, 12a, MCF-7, MCF-7-p95, MCF-7-CTF, MCF-7-HER2, SKBR3, SKBR3-CTF y MDA-MB-453. El eje x muestra los niveles de p95 en área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ , tal y como se expone en el Ejemplo 4. En la Figura 12b, los resultados del ensayo de un único anticuerpo se muestran para las muestras tumorales de la Cohorte A, que han sido clasificadas como p95-positivas o p95-negativas en



función de los datos del inmunoblot. El eje x muestra las líneas celulares p95-positivas o negativas; el eje y muestra los niveles de p95 en área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

5 Las Figuras 12c y 12d muestran los mismos parámetros de líneas celulares y muestras de tumores utilizando un sistema de ensayo de dos anticuerpos en el que tanto D9.1, que es específico para p95, como Ab8, que es específico para el dominio intracelular de HER2, se utilizan para detectar p95. El anticuerpo Ab8 está etiquetado con biotina; el anticuerpo D9.1 tiene un VeraTag clivable, lo que permite un ensayo de proximidad en el que la presencia de los dos anticuerpos dentro de la distancia efectiva de la misma molécula de p95 causa la liberación del fluoróforo del VeraTag. Como muestran los datos, la separación de subgrupos p95-negativos y p95-positivos se mantiene con esta forma de ensayo. El eje x muestra las líneas celulares p95-positivas o negativas; el eje y muestra los niveles de p95 en área relativa pico multiplicada por  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ .

10 La Figura 13 muestra la inhibición del crecimiento de la línea celular del cáncer de mama SKBR3 y BT474 utilizando anticuerpos anti-p95 en comparación con 4D5, la versión murina de trastuzumab. Varios anticuerpos monoclonales generados con ratones a los que se les administró el péptido D de p95 se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento en células SKBR3 y BT474, de las que se sabe que expresan elevados niveles de HER2. Se utilizó 4D5 como control positivo. Se utilizó un anticuerpo (A3) con un péptido no relacionado como control negativo. Los tres paneles superiores muestran los resultados para las células SKBR3; los tres paneles inferiores muestran los resultados para las células BT474. El eje x muestra la concentración de anticuerpos; el eje y muestra la diferencia de absorbancia a 492nm y 690nm. En este experimento, se cultivaron las células durante tres días en presencia de un anticuerpo y, a continuación, se valoró el crecimiento utilizando el ensayo XTT. Los resultados sugieren que D3.4 y D4.1 inhiben el crecimiento de las células SKBR3 pero no de las células BT474.

15 La Figura 14 muestra el gráfico del patrón del efecto del tratamiento en la subpoblación (STEPP) generado para examinar la tasa de supervivencia libre de progresión (PFS) 12 meses después del tratamiento con trastuzumab en toda la distribución de H2T. Se ordenaron grupos de 30 pacientes de menor a mayor por H2T. Se observó una tendencia de probabilidad creciente de mantenerse libre de progresión tras 12 meses a mayor H2T. Sin embargo, a los niveles de H2T más elevados se observó una pronunciada caída en la tasa de PFS, coherente con una reducción de la sensibilidad al trastuzumab.

20 La Figura 15 muestra un análisis de Kaplan-Meier (KM) que compara la PFS pacientes FISH(-), H2T bajo ( $\log_{10}\text{H2T} < 1,25$ ) con la de pacientes FISH(+), H2T alto ( $\log_{10}\text{H2T} > 1,95$ ) y la de pacientes FISH(+), H2T intermedio ( $1,25 < \log_{10}\text{H2T} < 1,95$ ). Los límites se identificaron por el valor p más bajo en un análisis de escaneo posicional. Los análisis KM demostraron que los pacientes que eran FISH(+), H2T intermedio tenían una PFS notablemente más prolongada que los pacientes FISH(-), H2T bajo (media de PFS de 12,6 frente a 4,5 meses; ratio de riesgo (HR) = 0,34;  $p < 0,0001$ ). Los pacientes FISH(+), H2T alto presentaban una PFS no mejor que los pacientes FISH(-), H2T bajo (media de PFS de 4,6 frente a 4,5 meses; HR = 0,7;  $p = 0,68$ ).

La Figura 16 muestra la discriminación de poblaciones de pacientes por H2T y p95 (N=90).

25 Los análisis anteriores de esta cohorte utilizando medidas VeraTag de la expresión de la proteína de HER2 (H2T) identificaron un subgrupo de H2T alto con un TTP más prolongado que el subgrupo de H2T bajo. Se identificó un límite para p95 por el valor p más bajo en un análisis de escaneo posicional.

Esta Figura muestra los análisis de Kaplan-Meier (KM) que comparan el % libre de progresión (TTP) de pacientes con H2T bajo ( $\log_{10}\text{H2T} < 1,25$ ) con pacientes con H2T alto ( $\log_{10}\text{H2T} \geq 1,25$  o lineal  $>13,8$ ) y p95 bajo ( $\log_{10}\text{H2T} < 90$ ) con pacientes con H2T alto ( $\log_{10}\text{H2T} \geq 1,25$ ) y p95 alto ( $\log_{10}\text{H2T} > 90$ ).

30 Los análisis KM demostraron que los pacientes con H2T bajo tenían una media de TTP significativamente menor (en respuesta al trastuzumab) que los pacientes con H2T alto, bajo 95 (media de TTP de 4,4 frente a 11,7; ratio de riesgo (HR) = 2,4;  $p=0,0003$ ). Los pacientes con H2T alto, p95 alto también presentaban una media de TTP notablemente menor en comparación con los pacientes con H2T alto/p95 bajo (media de TTP 7,2 frente a 11,7 meses; ratio de riesgo (HR)=1,9,  $p=0,017$ ). Unos resultados similares se observaron para la supervivencia global, donde los análisis KM para la OS demostraron que los pacientes con H2T bajo tenían una media de OS significativamente menor (en respuesta al trastuzumab) que los pacientes con H2T alto, bajo 95 (media de OS de 29 frente a 48 meses; ratio de riesgo (HR) = 1,9;  $p=0,042$ ). Los pacientes con H2T alto, p95 alto también presentaban una media de OS notablemente menor en comparación con los pacientes con H2T alto/p95 bajo (media de OS de meses frente a 48 meses; ratio de riesgo (HR)=2,3,  $p=0,0095$ ).

35 La Figura 17 muestra análisis de Kaplan-Meier (KM) que comparan el porcentaje libre de progresión (tiempo hasta la progresión, TTP) de varios subgrupos de la cohorte Lipton, definido por mediciones VeraTag del HER2 total (H2T alto o bajo) y p95HER2 (p95 alto o bajo). Los límites se identificaron por el valor p más bajo en un análisis de screening posicional. H2T alto = ( $\log_{10}\text{H2T} > 1,25$  o en una escala lineal  $>13,8$ ). Bajo H2T =  $\log_{10}\text{H2T} \leq 1,25$  o en una escala lineal,  $\leq 13,8$ . p95 bajo =  $p95 \leq 90$  y p95 alto =  $p95 > 90$  (en una escala lineal).

Los análisis KM demostraron que los pacientes FISH-positivos, K2T alto y p95 bajo (línea verde) presentaban una media (notablemente) superior de TTP que los pacientes FISH-negativos, H2T bajo (línea roja). Los pacientes FISH-positivos, H2T bajo (línea azul) presentaban una PFS superponible (es decir, no mejor) que los pacientes FISH-negativos, H2T bajo (línea roja). Por otra parte, los pacientes

5 FISH-positivos, H2T alto y p95 bajo (línea naranja) presentaban también una PFS prácticamente superponible con la de otros dos grupos menos favorecidos indicados por las líneas roja y azul (FISH-negativos, H2T bajo y FISH-positivos, H2T bajo, respectivamente). El grupo con los mejores resultados en este estudio fue el grupo verde, que fueron FISH-positivos, H2T alto y p95 bajo.

#### Descripción detallada de la invención

10 "Anticuerpo" significa una inmunoglobulina que se une, y por tanto se define como complementaria a, una organización espacial y polar concreta de otra molécula. El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante, y se puede preparar mediante técnicas bien conocidas en la técnica, tales como inmunización de un huésped y recogida de suero (policlonal) o mediante la preparación de líneas

15 celulares híbridas continuas y la recogida de la proteína secretada (monoclonal), o bien clonando y expresando secuencias de nucleótidos o versiones mutagenizadas de estas que codifican al menos las secuencias de aminoácidos necesarias para la unión. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de esta, y las inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, tales como IgA, Id., IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de estas pueden incluir Fab, Fv, y F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y similares. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos monocatenarios, anticuerpos

20 quiméricos, anticuerpos humanizados o cualquier otro derivado de anticuerpo conocido por un experto en la técnica que conserve la actividad de unión específica para un sitio de unión concreto. Por otra parte, se pueden utilizar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando proceda, siempre que se mantenga la afinidad de unión para un sitio de unión concreto. Se pueden encontrar orientaciones para la producción y selección de anticuerpos y derivados de anticuerpos para su

25 uso en inmunoensayos, incluyendo aquellos ensayos que emplean etiquetas moleculares liberables (como se describe más abajo) en textos y manuales disponibles, tales como Harlow y Lane, 1988, *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, Nueva York.

30 "Compuesto de unión" se refiere 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 la superficie celular, una proteína, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina, o cualquier otra entidad molecular que sea capaz de unirse de forma

35 específica a una molécula o complejo diana. En una realización, la molécula diana es una proteína o complejo proteico. En otra realización, un compuesto de unión comprende asimismo 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 y cuantificarse como correlativo de la presencia del compuesto de unión, que está unido a la proteína diana.

40 En otro ejemplo específico, el primer o el segundo compuesto de unión puede generar una molécula que actúa conjuntamente con una sonda de proximidad dentro de una proximidad efectiva, produciendo una señal que está correlacionada con la presencia de la proteína diana. Por otra parte, en otra realización, los compuestos de unión pueden tener etiquetas moleculares que interactúan entre sí dentro de una

45 proximidad efectiva para formar un complejo que genera una señal o se pueden detectar y medir de una manera que está correlacionada con la presencia de la proteína diana. Más concretamente, la proteína o el complejo diana puede ser p95 o un complejo de p95.

"Fracción de unión" significa cualquier molécula a la que se pueden unir, de forma directa o indirecta, etiquetas moleculares y que es capaz de unirse a un analito. Las fracciones de unión incluyen, entre otros,

50 anticuerpos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas orgánicas de un peso molecular de hasta 1000 Daltons y que contienen átomos seleccionados del grupo compuesto por hidrógeno, carbono, oxígeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Preferiblemente, las fracciones de unión son anticuerpos.

"Líneas celulares" se refiere a células que han sido separadas de su tejido original, que se han multiplicado por clonación y/o mantenido en un cultivo. Como ejemplos específicos, se pueden obtener

55 líneas celulares de cada tipo de cáncer y se pueden obtener múltiples líneas celulares diferentes de muestras del mismo tipo de cáncer. Entre los ejemplos de diferentes tipos de líneas celulares se incluyen, por ejemplo, líneas celulares del cáncer de mama, como MCF-7, MDA-MB-231, SK-BR-3, T-47D y ZR-75-1.

"Agente quimioterapéutico" significa una sustancia química que se emplea para tratar una patología, en particular un cáncer.

60 Un "ligamiento clivable", a efectos del presente, se refiere a un grupo de unión química que puede ser clivado para liberar una etiqueta molecular detectable conectada a una fracción de unión con el ligamiento clivable.

Una "fracción inductora del clivaje" o "agente de clivaje", a efectos del presente, es un grupo que produce una especie activa que es capaz de clivar un ligamiento clivable. Preferiblemente, la especie activa es una especie química que muestra una actividad efímera, por lo que los efectos inductores del clivaje se producen únicamente en las proximidades del sitio en el que se genera.

5 Una "sonda de clivaje", a efectos del presente, se refiere a un reactivo que comprende una fracción inductora del clivaje, tal como se define aquí, y un compuesto de unión como un anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de la superficie celular, una proteína, como estreptavidina, una molécula pequeña, como biotina, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular capaz de unirse a una  
10 molécula o proteína diana o a un complejo molecular estable.

"Proximidad efectiva", a efectos del presente, describe la distancia entre dos compuestos de unión que es suficiente para generar una señal detectable, indicando la presencia de la molécula diana. Por ejemplo, una sonda de proximidad y un compuesto de unión que se encuentran unidos en p95 (o con otro analito de interés) dentro de una proximidad efectiva generarán una señal detectable, indicando y/o cuantificando  
15 la presencia de p95 y/o de un complejo de p95. Preferiblemente, el rango de proximidad efectiva para muchos sistemas de detección es inferior a 400 nM, preferiblemente inferior a 300 nM, preferiblemente inferior a 200 nM, preferiblemente inferior a 100nM, y preferiblemente inferior a 50 nM.

"Epítipo" se refiere a un sitio en la superficie de una molécula, normalmente una proteína, al que se une la molécula del anticuerpo u otro compuesto de unión. Por lo general, una proteína dispone de varios o  
20 muchos epítipos diferentes y reacciona con anticuerpos con especificidades diferentes. Un epítipo preferible es un sitio de fosforilación de una proteína. Los determinantes antigénicos preferibles son epítipos crípticos que se encuentran en la secuencia de aminoácidos de Her2 que no resultan accesibles para la unión (por ejemplo, por parte de compuestos de unión) en la molécula de longitud completa, pero que se revelan y resultan accesibles para la unión en la versión p95 truncada de Her2.

25 "Exosoma" se refiere a una vesícula de la membrana que se ha desprendido de una membrana celular en un entorno extracelular. Los exosomas y otras vesículas de la membrana contienen fracciones unidas a la membrana, como proteínas, que pueden ser utilizadas, por ejemplo, en ensayos para detectar estas fracciones, como p95.

30 "Dominio extracelular" se refiere a una porción de una molécula que se encuentra fuera de la membrana de una célula. Un ejemplo de un dominio extracelular sería, entre otros, la porción de una proteína transmembrana que se encuentra fuera de la célula. Más concretamente, un ejemplo sería el dominio extracelular de HER-2, que se puede clivar para generar un ectodominio desprendido y una proteína p95 truncada unida a la membrana.

35 "FFPE" se referirá a una muestra o muestras fijadas con formalina e introducidas en parafina. Estas muestras se utilizan típicamente, por ejemplo, en ensayos para complejos de proteínas y receptores en forma de secciones finas, por ejemplo, de 3-10 µm de grosor, de tejido fijado montado en un portaobjetos o superficie equivalente. Estas muestras también se someten típicamente a un procedimiento de rehidratación convencional y, opcionalmente, a un procedimiento de recuperación de antígeno como preliminar o parte de las mediciones del ensayo.

40 "Her-2," "ErbB2," "c-Erb-B2," "HER2," "Her2," y "new" se utilizan de forma intercambiable en el presente y se refieren al Her-2 nativo, y variantes alélicas de este, tal y como se describe, 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 en el número de acceso Genebank X03363. Salvo que se indique lo contrario, los términos "Her-2," "ErbB2," "c-Erb-B2," "HER2," y "Her2", cuando se utilizan en el presente, se refieren a la proteína humana. El gen que codifica  
45 Her2 se denomina en el presente "erbB2".

A efectos del presente, "agente que actúa sobre Her-2" se refiere a un compuesto que puede inhibir la actividad biológica de Her-2. Estas actividades biológicas incluyen, entre otras, dimerización, autofosforilación, fosforilación de otro receptor, transducción de señales y similares. Las actividades biológicas pueden incluir, entre otras cosas, la supervivencia celular y la proliferación celular, y la  
50 inhibición de tales actividades por parte de un agente que actúa sobre Her-2 podría ser la muerte celular directa o indirecta (por ejemplo, ADCC), la alteración de complejos proteicos o la formación de complejos, la modulación del tráfico de proteínas o la inhibición de enzimas. Las actividades biológicas también pueden incluir la respuesta del paciente que se recoge en la presente solicitud. Entre los ejemplos de agentes que actúan sobre Her-2 se incluyen, por ejemplo, BIBW 2992, HKI- 272, 4D5, pertuzumab, trastuzumab, Herceptin-DM-1, AEE-788 y lapatinib.

55 "Alto" se refiere a una medida que es mayor de lo normal, como una medida predeterminada o la medida de un subgrupo o que es relativamente mayor que la medida de otro subgrupo.

60 Por ejemplo, un nivel alto de Her-2 o p95 se puede referir a una medida que es igual o mayor que una medida predeterminada, como un límite predeterminado. Un nivel alto de Her-2 o p95 también se puede referir a una medida de Her-2 o p95 donde un subgrupo con un nivel alto de Her-2 o p95 presenta unos niveles relativamente mayores de Her-2 o p95 que otro subgrupo. Por ejemplo, de acuerdo con la

presente especificación, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos dividiendo las muestras en función de un punto matemáticamente determinado, como, por ejemplo, una media, creando así un subgrupo cuya medida es alta (es decir, mayor que la media) y otro subgrupo cuya medida es baja. Her-2 o p95 se puede medir por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, utilizando un ensayo VeraTag o cualquier método de inmunohistoquímica (IHC) estándar como HercepTest®.

A efectos del presente, "probable" se refiere a una mayor probabilidad de que tenga lugar un elemento, 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 que un sujeto o grupo de sujetos de referencia.

"Prolongado", a efectos del presente, se refiere a una medida temporal que es mayor que una medida predeterminada o la medida de un subgrupo que es relativamente más prolongada que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, con respecto a la longevidad de un paciente, una progresión prolongada se refiere a una progresión en el tiempo que es mayor de lo previsto. El hecho de si una progresión en el tiempo es prolongada o no se puede determinar según cualquier método disponible para un experto en la técnica.

"Bajo" es un término que se refiere a una medida que es menor de lo normal, como una medida predeterminada o la medida de un subgrupo que es relativamente menor que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, un nivel bajo de Her-2 o p95 se puede referir a un método que es menor que una medida predeterminada, como un límite predeterminado. Un nivel bajo de Her-2 o p95 también puede significar una medida donde un subgrupo tiene un nivel bajo de Her-2 o p95 relativamente menor que el de otro subgrupo. Por ejemplo, de acuerdo con la presente especificación, se pueden crear dos subgrupos de pacientes distintos dividiendo las muestras en función de un punto matemáticamente determinado, como, por ejemplo, una media, creando así un subgrupo cuya medida es baja (es decir, menor que la media) y otro subgrupo cuya medida es alta (es decir, mayor que la media). Un experto en la técnica puede medir Her-2 o p95 por cualquier método conocido, como, por ejemplo, utilizando el método VeraTag o cualquier método de inmunohistoquímica (IHC) estándar como HercepTest®.

Una "etiqueta molecular", a efectos del presente, se refiere a una molécula que se puede medir de forma directa o indirecta, se puede distinguir de otras moléculas en base a una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se van a separar, incluyendo, por ejemplo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, la solubilidad, la pKa, la hidrofobicidad, la carga, el ratio carga/masa, la polaridad o similares. En una realización, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se diferencian por la movilidad electroforética y las características de detección óptica y se pueden separar mediante electroforesis. En otra realización, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se pueden diferenciar por el peso molecular, la forma, la solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, polaridad y se pueden separar mediante HPLC de fase normal o fase inversa, HPLC con intercambio de iones, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas, cromatografía gaseosa o una técnica similar.

La medición de etiquetas moleculares también puede implicar el uso de interacciones moleculares secundarias, con o sin otra modificación, para detectar, mejorar o amplificar una señal mensurable que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de un analito, como p95 o un complejo de p95. En una realización, un conjunto de dos o más etiquetas moleculares pueden interactuar dentro de una proximidad efectiva para producir una señal mensurable. Como etiquetas moleculares, se puede generar una señal mensurable, por ejemplo, por 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 pueden generar una señal mensurable o que se pueden medir utilizando métodos de detección conocidos en la técnica incluyen, entre otros, FRET, BRET, BiFC, LCI y QPCR.

"Límite óptimo", a efectos del presente, se refiere al valor de una medida predeterminada en sujetos que exhiben determinados atributos que permiten la mejor discriminación entre dos o más categorías de un atributo. Por ejemplo, un límite óptimo que permite discriminar mejor entre dos categorías, como una expresión de p95 alta y una expresión de p95 baja, resultaría útil para determinar la supervivencia global. Los límites óptimos se pueden utilizar para separar a los sujetos con valores más bajos o más altos del límite óptimo con el fin de optimizar el modelo de predicción.

La "supervivencia global" u "OS" se refiere a un tiempo medido desde el comienzo del tratamiento hasta la muerte o censura. La censura se puede producir por la conclusión de un estudio o por un cambio de tratamiento. La supervivencia global puede hacer referencia a una probabilidad, como, por ejemplo, la probabilidad cuando se representa en un gráfico de Kaplan-Meier de continuar vivo en un momento determinado, siendo ese tiempo el comprendido entre el comienzo del tratamiento y la muerte o censura.

"p95" se refiere a una porción de HER-2 C-terminal y truncada en el extremo N-terminal. "p95" también se ha denominado "receptor de ErbB2 truncado", "p95<sup>ErbB2</sup>", "p95HER2", y más generalmente "HER-2/neu NH2-terminalmente truncado" y "fragmentos C-terminales de HER2" para reflejar el hecho de que "p95" representa una familia de proteínas HER2 truncadas, pero no idénticas en tamaño a las originalmente identificadas por tener un peso molecular aparente de 95 kiloDaltons. Se cree que p95 se produce al menos a través de dos mecanismos distintos. p95 puede resultar por el clivaje proteolítico de HER2 de

longitud completa. p95 también puede ser el resultado de un inicio traslacional alternativo en sentido descendente desde la metionina primera canónica, incluyendo, por ejemplo, M611 y M687.

"Complejo p95" se refiere a un complejo de proteínas donde al menos uno de sus miembros es p95. Entre los ejemplos de posibles complejos p95 se incluyen homodímeros de p95, así como heterodímeros compuestos por p95 y Her2 de longitud completa, así como otros miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico, incluyendo Her1, Her3 y Her4.

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, anticuerpo, un péptido, un ligando peptídico o no peptídico para un receptor de la superficie celular, una proteína, como estreptavidina, una molécula pequeña, como biotina, un oligonucleótido, un análogo de oligonucleótido, como un ácido nucleico peptídico, una lectina o cualquier otra entidad molecular capaz de unirse específicamente a una molécula o proteína diana o a un complejo molecular estable. Por ejemplo, una sonda de proximidad compuesta por un anticuerpo dirigido a p95 con una etiqueta molecular puede ser capaz de unirse a p95 dentro de una proximidad efectiva con uno o más compuestos de unión de p95, 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 ácidos nucleicos 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 por cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden unir fluoróforos a los ácidos nucleicos como indicadores de hibridación. En una realización preferible, la hibridación se mide con un método de amplificación del ácido nucleico, por ejemplo, un método de amplificación por círculo rodante (véase, por ejemplo, Lizardi *et al.*, (1998) *Nat Genet.* 19: 225-232).

"RECIST" significa "Criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos" y es un conjunto de normas publicadas que definen cuando los pacientes mejoran ("responden"), permanecen sin cambios ("estables") o empeoran ("progresión") durante los tratamientos. La respuesta definida por los criterios RECIST ha sido publicado, por ejemplo, en *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 92, n.º 3, 2 de febrero de 2000.

"Responder" al tratamiento y otras formas de este verbo, a efectos del presente, se refiere a 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 medida apropiada, por ejemplo, por masa o volumen. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente que actúa sobre Her2, si el sujeto experimenta una esperanza de vida ampliada en aproximadamente un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más, con respecto a la esperanza de vida prevista en caso de que no se administrase ningún tratamiento. En otro ejemplo, un sujeto responde al tratamiento con un agente, si el sujeto tiene una supervivencia global o un tiempo hasta la progresión superior. Se pueden utilizar diversos métodos para determinar si un paciente responde a un tratamiento, incluyendo los criterios RECIST mencionados en el presente.

"Muestra" o "muestra de tejido" o "muestra del paciente", "muestra de tejido o células del paciente" se refieren a una serie de células similares obtenidas de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido puede ser tejido sólido, por ejemplo, de un tejido fresco, aspirado o biopsia o tejido u órgano congelado y/o preservado; sangre o cualquier componente de la sangre, fluidos corporales como fluido cerebroespinal, fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial, o células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se encuentran naturalmente intercombinados con el tejido en la naturaleza, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares. Las células se pueden fijar de manera convencional, como FFPE.

"Corto", a efectos del presente, se refiere a una medida temporal que es menor de lo normal, por ejemplo que una medida predeterminada o la medida de un subgrupo que es relativamente más breve que la medida de otro subgrupo. Por ejemplo, con respecto a la longevidad de un paciente, una progresión corta se refiere a una progresión en el tiempo que es más corta de lo previsto. El hecho de si una progresión en el tiempo es corta o no se puede determinar según cualquier método disponible para un experto en la técnica.

A efectos del presente, "evento significativo" se referirá a un evento en la enfermedad de un paciente que es importante en opinión de un experto en la técnica. Los ejemplos de acontecimientos significativos incluyen, por ejemplo, el diagnóstico primario, la muerte, la recurrencia, la determinación de que la enfermedad de un paciente es metastásica, la recidiva de la enfermedad de un paciente o la progresión de la enfermedad de un paciente desde cualquiera de las etapas anteriormente mencionadas a otra. Un evento significativo puede ser cualquier evento importante utilizado para valorar la OS, el tiempo hasta la progresión (TTP) y/o utilizar los criterios RECIST, determinados por un experto en la técnica.

A efectos del presente, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan de forma intercambiable. Tal como se

usa aquí, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, preferiblemente un mamífero incluyendo un no primate (por ejemplo, vaca, cerdo, caballo, burro, cabra, camello, gato, perro, cobaya, rata, ratón u oveja) y un primate (por ejemplo, un mono, como un macaco cangrejero, gorila, chimpancé o un ser humano).

5 "Terapia dirigida" se refiere al tratamiento terapéutico que intenta identificar y tratar células específicas implicadas en una enfermedad sin dañar o alterar las células normales. Los terapéuticos dirigidos pueden estar compuestos por, entre otros, moléculas pequeñas, como lapatinib e ivermectina/gleevec, anticuerpos monoclonales, como trastuzumab, o ácidos nucleicos, como ARNip utilizado para bloquear la expresión de productos genéticos que participan en los procesos patógenos. Las terapias dirigidas resultan útiles en el  
10 tratamiento de múltiples procesos patógenos, como el cáncer. A efectos del presente, "evolución" se referirá a la cantidad de tiempo entre un evento inicial y uno o más eventos posteriores. 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 los eventos significativos en el transcurso de la enfermedad, donde el primer evento puede ser el diagnóstico y el evento posterior puede ser, por ejemplo, la metástasis.

15 El "tiempo hasta la progresión" o "TTP" se refiere a un tiempo medido desde el comienzo del tratamiento hasta la progresión de un cáncer o censura. La censura se puede producir por la conclusión de un estudio o por un cambio de tratamiento. El tiempo hasta la progresión también se puede representar como una probabilidad, por ejemplo, en un gráfico de Kaplan-Meier donde el tiempo hasta la progresión puede representar las probabilidades de mantenerse libre de progresión durante un tiempo determinado, siendo  
20 ese tiempo el transcurrido entre el comienzo del tratamiento hasta la progresión o censura.

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

"Lisado tumoral" se refiere a la solución que se produce cuando las membranas de las células de los tumores se alteran, sea por métodos físicos o químicos. Normalmente los lisados tumorales contienen componentes representativos de la célula, incluyendo, por ejemplo, marcadores proteicos, enzimas, ácidos nucleicos y complejos de proteínas y otras moléculas que se pueden medir posteriormente en  
30 diversos ensayos.

El término "VeraTag" se refiere a ensayos individuales y multiplexados y multietiqueta, materiales, métodos y técnicas para realizar y utilizar estos ensayos, incluyendo, entre otros reactivos, procedimientos analíticos y software relacionados con estos ensayos. Los términos VeraTag, vTag y eTag se utilizarán de forma intercambiable.

35 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de p95 o un complejo de p95 en una muestra, donde el método comprende el suministro de una muestra y la determinación de la presencia y/o cantidad de p95 o complejo de p95 en la muestra utilizando los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 3. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de  
40 sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico.

50 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o la cantidad de p95 en una muestra, donde el método consiste en mezclar una muestra con un compuesto de unión y determinar la presencia y/o cantidad de compuesto de unión unido a p95 donde el compuesto de unión es un anticuerpo según las reivindicaciones 1 a 3. El compuesto de unión es capaz de unirse específicamente a p95. En una realización preferible de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. El anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares híbridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una  
60

realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico.

- 5 En una realización preferible, la determinación de la presencia y/o cantidad de compuesto de unión unido a p95 comprende asimismo el suministro de un segundo compuesto de unión, donde el segundo compuesto de unión es capaz de unirse específicamente al compuesto de unión unido a p95 y la determinación de la presencia y/o cantidad del segundo compuesto de unión como correlativa con la presencia y/o cantidad del compuesto de unión unido a p95. En una realización preferible, el segundo compuesto de unión es un anticuerpo.

10 El uso de un segundo compuesto de unión que es capaz de unirse específicamente al primer compuesto de unión y tiene una o más etiquetas moleculares puede ofrecer ventajas prácticas. Por ejemplo, se pueden testar múltiples primeros compuestos de unión específicos para p95 utilizando un único segundo compuesto de unión al que se unen una o más etiquetas moleculares, evitando la necesidad de unir etiquetas moleculares a cada uno de múltiples primeros compuestos de unión específicos para p95. En una primera realización preferible, el primer compuesto de unión es un anticuerpo de ratón y el segundo compuesto de unión es un anticuerpo anti-murino administrado a una especie no murina (por ejemplo, anticuerpos de cabra antimurinos) a los que se han unido etiquetas moleculares clivables. Normalmente los segundos compuestos de unión se etiquetan con sondas útiles para la detección.

15 Los sistemas de detección normalmente utilizados para detectar segundos compuestos de unión incluyen, por ejemplo, etiquetas moleculares clivables, como las descritas en el presente, radioetiquetas (es decir, radioisótopos como 1-125); enzimas que convierten un producto químico en una señal electroquímica o fluorescente colorimétrica mensurable (por ejemplo, peroxidasas) y proteínas fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde y sus múltiples derivados). Uno de los sistemas de detección utilizados más habitualmente, por ejemplo, para la inmunohistoquímica, consiste en conjugar peroxidasa de rábano (HRP) con un anticuerpo u otro compuesto de unión. A continuación se puede oxidar un sustrato mediante HRP, obteniendo un producto detectable por un método espectrofotométrico. Los sustratos para HRP incluyen tanto sustratos cromogénicos (por ejemplo, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina [TMB] o 3,3'-diaminobencidina [DAB]), que producen productos coloreados y sustratos quimioluminiscentes (por ejemplo, quimioluminiscencia por luminol mejorada [ECL]), que produce luz. Los métodos de detección por inmunohistoquímica que utilizan compuestos de unión secundarios y peroxidasas típicamente implican el etiquetado del compuesto de unión primario con una molécula pequeña que se puede unir a un segundo compuesto de unión que se ha conjugado con una peroxidasa (por ejemplo, un sistema de estreptavidina/biotina) o el uso de un anticuerpo secundario que se ha conjugado con peroxidasa dirigido al primer anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo de cabra anti-murino). A continuación se añade un sustrato en condiciones que permitirán la conversión en un producto de manera relativamente cuantitativa y después se utilizan métodos espectrofotométricos para detectar el producto.

20 El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal o recombinante y se puede preparar mediante técnicas conocidas en la técnica. Los anticuerpos pueden incluir una inmunoglobulina completa o un fragmento de esta, y las inmunoglobulinas incluyen las diversas clases e isotipos, como IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, IgM, etc. Los fragmentos de estas pueden incluir Fab, Fv, y F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y similares. Los anticuerpos también pueden ser anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o cualquier otro derivado de anticuerpo conocido por un experto en la técnica que conserve la actividad de unión específica para un sitio de unión concreto. Por otra parte, se pueden utilizar agregados, polímeros y conjugados de inmunoglobulinas o sus fragmentos cuando proceda, siempre que se mantenga la afinidad de unión.

25 Para facilitar el desarrollo de métodos para medir p95 en muestras biológicas, se crearon anticuerpos monoclonales específicos para p95. Los ratones se inmunizaron contra péptidos de p95 y se utilizaron métodos estándar recogidos en el presente y conocidos por un experto 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 Goding, 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; Zola H (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press).

30 En una realización, el método para crear hibridomas comienza por inmunizar a un animal huésped, como un ratón, para provocar la producción de linfocitos que produzcan anticuerpos dirigidos al péptido o proteína(s) de interés. También se pueden inmunizar linfocitos *in vitro*. El antígeno utilizado puede ser un péptido, una proteína o una célula que presenta el antígeno en la superficie de la célula. A continuación se recogen los linfocitos fusionados a través de métodos químicos (por ejemplo, con PEG) o eléctricos (por ejemplo, por electrofusión) con células de mieloma para formar células hibridomas, típicamente en condiciones que impiden el crecimiento y/o la supervivencia de las células madre del mieloma. Se deja que crezcan las células fusionadas 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 impide el crecimiento de células que carecen de hipoxantina-quinina-fosforribosil-transferasa (HPRT). La HPRT se suministra a la célula fusionada a través del linfocito asociado, permitiendo la supervivencia del hibridoma y evitando la supervivencia de las células madre del mieloma, que carecen de HPRT.

5 Los medios de cultivo en los que crecen los hibridomas (es decir, medios acondicionados) se someten normalmente a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno utilizando diversas técnicas (véase Voller, et al. (1978) *J. Clin. Pathol.* 31:507-520), incluyendo, entre otras, inmunoprecipitación o un ensayo de unión *in vitro* como el ensayo de 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), análisis radioinmunológico (RIA; véase Sonksen PH (1974) *Brit. Med. Bull.* 30:1-103), inmunoblot o citometría de flujo. Se determinó el perfil de los medios acondicionados de los hibridomas en una serie de ensayos, incluyendo ELISA (Figura 1), inmunoblot (Figura 2) y citometría de flujo (Figura 3). En realizaciones preferibles, se realizan ensayos que utilizan tanto células nativas como permeabilizadas como fijadas para identificar anticuerpos que pueden funcionar bien en aplicaciones que utilizan células o tejidos fijados, como la inmunohistoquímica (IHC). Los clones de interés se pueden subclonar limitando la dilución o mediante citometría de flujo de una sola célula.

Como apreciarán los expertos en la técnica, los anticuerpos monoclonales secretados por los clones de hibridoma (o subclones) se pueden purificar empleando procedimientos de purificación convencionales como, por ejemplo, diálisis, cromatografía por afinidad, electroforesis en gel o cromatografía en proteína A-sefarosa (o proteína L-agarosa).

Normalmente se utilizan múltiples métodos y reactivos para preparar muestras biológicas para el análisis. En el presente se exponen o mencionan varios métodos y los expertos en la técnica conocen otros muchos. Las muestras que contienen p95 adecuadas para su uso como biomarcadores pueden proceder de diversas fuentes, incluyendo cultivos celulares, tejidos de animales o plantas, biopsias de pacientes, sangre o similares. Preferiblemente, las muestras son de pacientes humanos. Las muestras se preparan para los ensayos de la invención utilizando técnicas convencionales, que pueden depender de la fuente de la que se tome una muestra. Para las biopsias y muestras médicas, se ofrecen orientaciones en las referencias siguientes: Bancroft JD & Stevens A, eds. 1977, *Theory and Practice of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, Edinburgo,; Pearse, 1980, *Histochemistry. Theory and applied.* 4<sup>th</sup> ed., Churchill Livingstone, Edimburgo.

Entre los ejemplos de muestras de tejido del paciente que se pueden utilizar se incluyen, entre otros, tejidos de mama, próstata, ovario, colon, pulmón, endometrio, estómago, glándula salival o páncreas. La muestra de tejido se puede obtener mediante diversos procedimientos, incluyendo escisión quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra biológica pueden ser células cultivadas *in vitro* y recogidas por centrifugación como perlas de células. En una realización, las muestras pueden ser muestras de sangre del paciente o tipos de células sanguíneas concretas o subconjuntos de tipos de células sanguíneas (por ejemplo, capas leucocitarias). En una realización, la muestra biológica puede ser de exosomas o muestras que contienen exosomas. Los exosomas son pequeñas vesículas (30-200 nm) que pueden ser secretadas por la mayoría de los tipos de células, incluyendo células tumorales (véase Mignot et al (2006) *J. Cell. Mol. Med.* 10:376-388), *in vivo* e *in vitro*. Se cree que los exosomas obtenidos de tumores desempeñan un papel importante en la capacidad de los tumores de evadir el sistema inmunitario y tienen potencial para las aplicaciones tanto de diagnóstico como terapéuticas (véase Taylor y Black (1985) *J. Natl. Cancer Inst.* 74:859-867) y, por tanto, son muestras biológicas de interés.

En una realización preferible, la muestra es una muestra de tumor. Entre los ejemplos de tipos de muestras de tumor se incluyen cánceres como, entre otros, carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y cánceres de tipo mixto. En una realización, el cáncer es un cáncer de huesos, como un sarcoma de Ewing, osteosarcoma y rabdomiosarcoma, y otros sarcomas de tejidos blandos. En otra realización, el cáncer es un tumor cerebral, por ejemplo oligodendroglioma, ependimoma, meningioma, linfoma o 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 cánceres adrenales, pancreáticos, de paratiroides, pituitaria y tiroides. En otra realización, el cáncer es un cáncer gastrointestinal, por ejemplo anal, colorrectal, de esófago, vesícula biliar, gástrico, hepático, pancreático y del intestino delgado. En otra realización, el cáncer es un cáncer ginecológico, por ejemplo cervical, endometrial, uterino, de trompas de Falopio, enfermedad trofoblástica gestacional, coriocarcinoma, de ovarios, vaginal y vulvar. En otra realización, el cáncer es un cáncer de cabeza y cuello, por ejemplo de laringe, orofaringe, paratiroides o tiroides. 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, linfoma de células T cutáneas, linfoma de Hodgkin o enfermedad no Hodgkin. En otra realización, el cáncer es un cáncer metastásico. En otra realización, el cáncer es un mieloma, por ejemplo un mieloma múltiple. En otra realización, el cáncer es un cáncer de pene. En otra realización, el cáncer es



un cáncer de próstata. En otra realización, el cáncer es un cáncer testicular. En otra realización, el cáncer es un cáncer de tiroides, por ejemplo papilar, folicular, medular o anaplásico o un carcinoma tiroideo indiferenciado. En otra realización, el cáncer es un cáncer del tracto urinario, por ejemplo de vejiga, riñones o uretra.

- 5 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 con muestras de tejido que han sido fijadas e introducidas en parafina, y se puede realizar un paso de desparafinado. Una muestra de tejido se puede fijar (es decir, preservar) utilizando una metodología convencional. Véase, por ejemplo, Lee G. Luna, HT (ASCP) Ed., 10 1960, *Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology* 3ª edición, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva 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 opción de utilizar un fijador se determina en función del propósito para el que se va a teñir 15 histológicamente o analizar de otro modo el tejido. Un experto en la técnica apreciará también que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijador utilizado.

- Por lo general, una muestra de tejido se fija primero y después se deshidrata a través de una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y empapa en parafina u otro medio de seccionamiento para que la muestra de tejido se pueda seccionar. Alternativamente, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones 20 obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido se puede introducir y procesar en parafina mediante una metodología convencional según las técnicas convencionales o descritas en el presente. Una vez que se ha introducido la muestra de tejido, puede ser seccionada con un micrótopo según las técnicas convencionales. Las secciones pueden tener un grosor de entre unos tres y doce micrones y preferiblemente de entre unos cinco y diez micrones. En una realización, una sección puede tener un área 25 de entre unos 10 mm<sup>2</sup> y 1 cm<sup>2</sup>. Una vez cortadas, las secciones se pueden fijar en los portaobjetos mediante diversos métodos estándar. Los ejemplos de adhesivos para portaobjetos incluyen, entre otros, silano, gelatina y poli-L-lisina. Las secciones introducidas en parafina se pueden unir a portaobjetos cargados positivamente y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

- Si se ha utilizado parafina para introducir la muestra, por lo general las secciones de tejido se desparafinan y rehidratan antes de proceder a la detección de biomarcadores. Las secciones se pueden desparafinar mediante diversas metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, se pueden utilizar 30 xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes según las técnicas convencionales descritas por las referencias que se mencionan en el presente. Alternativamente se pueden utilizar agentes no orgánicos para el desparafinado disponibles en el mercado, como Hemo-De® (CMS, Houston, Tex).

- 35 Se pueden preparar lisados celulares de cultivos de tejido de mamíferos, o tejidos frescos o congelados, utilizando técnicas de lisado celular convencionales (por ejemplo, 0,14 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-Cl (pH 8,6), 0,5% Nonidet P-40, e inhibidores de fosfatasa y/o proteasa, cuando corresponda). Para los tejidos de mamífero frescos, la preparación de las muestras puede incluir también un paso de separación tisular, como triturado, troceado, molido o sonicación.

- 40 Los lisados celulares se prepararon y testaron mediante inmunoblot con Ab8 o CB11, anticuerpos contra Her2 que se unen a un epítipo intracelular de Her2 y, por tanto, son capaces de detectar tanto Her2 de longitud completa como p95. Los resultados confirman que las dos líneas celulares SKBR3 y MCF7 sometidas a transfección con los vectores de expresión de p95 expresan p95 y que Her2 de longitud 45 completa sometido a transfección también se expresa en las células MCF7. La línea celular SKBR3 expresa altos niveles endógenos de Her2, así como ciertos niveles de p95, como cabe esperar porque se sabe que SKBR3 se desprende de Her2-ECD (véase Zabrecky et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266:1716-1720).

- Se testaron seis líneas celulares utilizando anticuerpos monoclonales específicos para p95 putativos: MCF7; MCF7 transfectado con Her2 de longitud completa, p95 o CTF; SKBR3 y SKBR3 transfectado con 50 fragmentos carboxi terminales (CTF) de HER2. CTF y p95 se utilizan de forma intercambiable para describir la familia de HER2 truncados con pesos moleculares aparentes determinados mediante PAGE similares a 95 kiloDalton (véase la definición de p95 y Anido et al. (2006) *EMBO J.* 12:3234-3244). Los resultados se muestran en la Figura 6. Se mostraron dos anticuerpos monoclonales por ser específicos para p95, D8.2 y D9.1.

- 55 La capacidad del anticuerpo específico para p95 D9.1 para detectar p95 en tumores se testó en muestras de ensayo, que se seleccionaron por presentar una alta probabilidad de contener p95. Las muestras tumorales Her2-positivas de nódulo positivos (ambos factores correlacionados con la positividad de p95) se obtuvieron en forma de muestras emparejadas frescas-congeladas y fijadas con formalina e introducidas en parafina. Se prepararon inmunoblots con lisados de material fresco-congelado y se 60 sometieron a una sonda con CB11, un anticuerpo disponible en el mercado dirigido al dominio intracelular de Her2. Los resultados, mostrados en la Figura 7a, permitieron la designación de p95-positivas de 7 de las 12 muestras de tumores. Las muestras FFPE de los 12 tumores se testaron, a continuación, en el ensayo VeraTag, utilizando el anticuerpo D9.1 tal y como se describe en el Ejemplo 4 (véanse también,

por ejemplo, las Figuras 7b y 7c). Las muestras tumorales son de naturaleza heterogénea, por lo que se esperan ciertas diferencias en los niveles de p95 de las muestras frescas-congeladas y FFPE.

Los controles de isotipo se realizan normalmente para eliminar la posibilidad de que los resultados de unión se deban al isotipo concreto del anticuerpo más que al anticuerpo individual.

5 Por otra parte, los expertos en la técnica apreciarán que cualquier "ruido" de la señal observado en los controles de isotipo se puede sustraer de la señal total, ofreciendo potencialmente un resultado más perfeccionado. Cuando se realizó un experimento de control de isotipo (véanse las Figuras 8a y 8b) y el resultado de control se restó del resultado del ensayo con D9.1, la diferencia entre la media de las poblaciones p95-positivas y p95-negativas se conservó y fue significativa (aproximadamente una  
10 diferencia de 4x con un rango dinámico aproximado de 10x, véase la Figura 8c).

En un tercer aspecto, la divulgación describe un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de p95 o un complejo de p95 en una muestra, donde el método consiste en lo siguiente: mezclar (i) una muestra que puede contener p95 o un complejo de p95; (ii) una sonda de proximidad que es capaz de unirse a p95 o un analito que se une a p95 o un complejo p95, donde la sonda de proximidad tiene una  
15 proximidad efectiva; y (iii) al menos un compuesto de unión, donde ese compuesto de unión es capaz de unirse a p95 o un analito que se une a p95 y que tiene una o más sondas moleculares unidas, donde la unión de la sonda de proximidad y el compuesto de unión dentro de la proximidad efectiva produce una señal de las sondas moleculares que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de p95 o del complejo de p95. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión son capaces de unirse específicamente a p95. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprenden también un anticuerpo. En una realización preferible, la sonda de proximidad y/o el compuesto de unión comprenden además un anticuerpo, y cada anticuerpo se une a un epítipo específico de p95. El anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1. 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 mediante hibridación. La hibridación se puede cuantificar a través de cualquier método conocido por un experto en la técnica, como por ejemplo a través de la medición de las etiquetas moleculares unidas a las moléculas de ácido nucleico o la medición de la hibridación por cualquier método conocido por un experto en la técnica. En una realización preferible, la hibridación se mide a través de un método de amplificación de ácido nucleico, como por ejemplo el método de amplificación por círculo rodante. El anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico. Se pueden encontrar ejemplos de sondas de proximidad y compuestos de unión, como los que se exponen en el presente, por ejemplo en las Solicitudes de Patente USA 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 p95 o un complejo de p95 se pueden unir con múltiples sistemas de detección diferentes para medir la presencia y/o cantidad de p95 o de un complejo de p95. Cualquier método conocido por un experto en la técnica que sirva para determinar una cantidad de p95 o de un complejo de p95 puede ser utilizado según la presente invención. Estos métodos incluyen, entre otros, la transferencia de energía por resonancia de Foerster (FRET), transferencia de energía por resonancia de bioluminiscencia (BRET), complementación de fluorescencia biomolecular, ensayo de unión por proximidad (PLA), ensayo de proximidad de centelleo (SPA) y amplificación por círculo rodante (RCA), o cualquier otro método para detectar los dúplex de ácido nucleico formados por la proximidad de una sonda de unión y una sonda de proximidad con cadenas complementarias de ácidos nucleicos.

60 Para aplicar 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. Sin embargo, en determinadas aplicaciones el orden de adición puede ser relevante. Por ejemplo, es posible que se desee controlar la unión competitiva, como en un ensayo cuantitativo. O es posible que se desee controlar

la estabilidad del complejo formado. En estas aplicaciones, las reacciones se deben realizar por etapas.

Por lo general, las cantidades de cada reactivo se pueden determinar empíricamente. La cantidad de muestra utilizada en un ensayo se determinará por el número previsto de complejos diana presentes y los medios de separación y detección utilizados 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 de la muestra, por lo general a un exceso molar aproximado de al menos 1,5 y más preferiblemente 10 veces de exceso o más. En aplicaciones específicas, la concentración utilizada puede ser mayor o menor, 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 la superficie celular, normalmente en un medio acuoso, generalmente a un pH fisiológico (comparable al pH al que se cultivan las células), mantenidas mediante un tampón a una concentración aproximada de entre 10 y 200 nM. Se pueden utilizar tampones convencionales, así como otros aditivos convencionales necesarios, tales como sales, medios de cultivo, estabilizantes, etc. Normalmente se utilizan temperaturas fisiológicas y constantes. Las temperaturas de incubación normalmente oscilan entre unos 4° y 70°C, más habitualmente entre unos 15° y 45°C, y más habitualmente entre unos 25° y 37°C.

En una realización preferible, la sonda de proximidad comprende una sonda de proximidad que tiene una fracción inductora del clivaje y donde el compuesto de unión tiene una o más etiquetas moleculares unidas al compuesto de unión a través de un ligamiento clivable, donde el ligamiento clivable puede ser clivado dentro de la proximidad efectiva produciendo una señal que está correlacionada con la presencia y/o cantidad de p95. 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 específico de p95 o un analito que se une a p95. En una realización preferible de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. El anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1. 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, 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 tumoral congelada. En una realización preferible, la muestra comprende un lisado tumoral. En una realización preferible, la muestra comprende una muestra de cáncer de mama. En una realización preferible, la muestra es una muestra FFPE. En una realización preferible, la muestra es una muestra de sangre, plasma o linfa. En una realización preferible, la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes. En una realización preferible, la muestra contiene exosomas y/u otras vesículas. En una realización preferible, la muestra comprende líneas celulares. En una realización preferible, la medición puede ser cuantitativa en un amplio rango dinámico.

La medición de p95 o de un complejo de p95 utilizando etiquetas moleculares liberables ofrece múltiples ventajas, incluyendo la separación de las etiquetas moleculares liberadas de una mezcla de ensayo que proporciona un fondo notablemente reducido y una ventaja significativa en términos de sensibilidad y separación y detección que ofrece una capacidad de multiplexado útil para que múltiples componentes del complejo receptor se puedan medir de forma simultánea en el mismo ensayo. Los ensayos que utilizan estas etiquetas pueden tener diversas formas y se divulgan en las referencias siguientes: Patentes USA n.º 7 105 308; 6 627 400; 7 402 397; 7 402 398 y 7 402 399, así como en la Publicación de Patente Internacional n.º WO 2004/011900. Se pueden emplear diversas técnicas de separación que pueden distinguir moléculas basándose en una o más diferencias físicas, químicas u ópticas entre las moléculas que se van a separar, incluyendo, por ejemplo, la movilidad electroforética, el peso molecular, la forma, la solubilidad, la pKa, la hidrofobicidad, la carga, el ratio carga/masa o la polaridad. En una realización, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se diferencian en la movilidad electroforética y las características de detección óptica y se separan mediante electroforesis. En otra realización, las etiquetas moleculares de una pluralidad o conjunto se pueden diferenciar por el peso molecular, la forma, la solubilidad, pKa, hidrofobicidad, carga, polaridad y se separan mediante HPLC de fase normal o fase inversa, HPLC con intercambio de iones, electrocromatografía capilar, espectroscopia de masas o cromatografía gaseosa.

Se proporcionan etiquetas moleculares que se pueden separar en bandas o picos distintos a través de una técnica de separación después de que se hayan liberado de los compuestos de unión. La identificación y cuantificación de estos picos proporciona una medida o perfil de la presencia y/o cantidades de p95. Las etiquetas moleculares dentro de un conjunto pueden ser químicamente diversas; sin embargo, por conveniencia normalmente se utilizan conjuntos de etiquetas moleculares químicamente relacionadas. Por ejemplo, pueden ser todas péptidos o pueden estar compuestas por diferentes combinaciones de los mismos bloques básicos o monómeros, o pueden estar sintetizadas utilizando la misma estructura básica con diferentes grupos sustitutos para impartir diferentes características de separación. El número de etiquetas moleculares en una pluralidad puede variar en función de diversos

factores, incluyendo el modo de separación empleado, las etiquetas utilizadas en las etiquetas moleculares para la detección, la sensibilidad de las fracciones de unión y la eficiencia con la que los ligamientos clivables se clivan.

5 Las mediciones realizadas directamente en muestras de tejido se pueden normalizar incluyendo mediciones sobre dianas celulares o tisulares que son representativas del número total de células de la muestra y/o de los números de subtipos concretos de células de la muestra (véanse, por ejemplo, la Solicitud de Patente Provisional USA 61/015 608 y la Publicación de Patente Internacional WO2009086197). La medición adicional puede ser preferible, o incluso necesaria, debido a la heterogeneidad celular y tisular de las muestras de los pacientes, en particular de las muestras de tumor,  
10 que pueden comprender fracciones sustanciales de células normales.

En una realización, un compuesto de unión puede estar representado por la fórmula siguiente:



15 donde B es la fracción de unión; L es un ligamiento clivable y E es una etiqueta molecular. En ensayos homogéneos, el ligamiento clivable L puede ser un ligamiento sensible a la oxidación y más preferiblemente es un ligamiento que puede ser clivado mediante oxígeno singlete. La fracción “-(L-E)<sub>k</sub>” indica que un único compuesto de unión puede tener múltiples etiquetas moleculares unidas mediante ligamientos clivables. En un aspecto, k es un número entero mayor o igual a uno, pero en otras realizaciones, k puede ser mayor que varios cientos, por ejemplo entre 100 y 500, o k es un número entero de entre varios cientos y varios miles, como entre 500 y 5000. Normalmente, cada pluralidad de  
20 diferentes tipos de compuestos de unión tiene una etiqueta molecular diferente E. Los ligamientos clivables, por ejemplo ligamientos sensibles a la oxidación, y las etiquetas moleculares E se unen a B mediante procesos químicos convencionales.

Preferiblemente B es un anticuerpo que se une de forma específica a una diana, como p95.

25 Los anticuerpos específicos para los epítomos de p95 se proporcionan en los ejemplos incluidos en el presente documento. Las composiciones de anticuerpos se pueden producir fácilmente a partir de una amplia variedad de anticuerpos disponibles en el mercado, tanto monoclonales como policlonales, o a través de los métodos divulgados en el presente documento.

30 El ligamiento clivable L puede ser prácticamente cualquier grupo de unión química que pueda ser clivado en condiciones que no degraden la estructura ni afecten a las características de detección de la etiqueta molecular liberada E. Cuando se utiliza una sonda de clivaje en un formato de ensayo homogéneo, el ligamiento 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 clivan los ligamientos clivables que se encuentran en una proximidad efectiva de la sonda de proximidad. Típicamente, este agente debe ser activado introduciendo un cambio físico o químico en la mezcla de reacción, para que el agente produzca una especie activa  
35 efímera que se difunda hasta un ligamiento clivable para efectuar el clivaje.

En un formato no homogéneo, dado que los compuestos de unión específicamente unidos se separan de los compuestos de unión no unidos, existe una selección más amplia de ligamientos clivables y agentes de clivaje disponibles. Los ligamientos clivables no solamente pueden incluir ligamientos que son sensibles a la reacción con una especie reactiva que actúa localmente, como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno singlete o similares, sino también ligamientos que son sensibles a agentes que operan en toda una mezcla de reacción, como ligamientos sensibles a las bases, ligamientos fotoclivables, ligamientos clivables por reducción, ligamientos clivados por oxidación, ligamientos sensibles a ácidos y ligamientos peptídicos clivables por proteasas específicas. Entre las referencias que describen muchos de estos ligamientos se incluyen Greene y Wuts, 1991, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2ª edición, John Wiley & Sons, Nueva York; Hermanson, 1996, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Nueva York; y la Patente USA n.º 5 565 324.

40 La etiqueta molecular E de la presente invención puede comprender una etiqueta electroforética como la que se describe en las siguientes referencias cuando la separación de 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.* 2:165-168; y las Patentes USA n.º 4 650 750; 5 360 819; 5 516 931; y 5 602 273.

45 La etiqueta molecular E es preferiblemente un compuesto orgánico soluble en agua que es estable con respecto a la especie activa, especialmente oxígeno singlete, y que incluye un grupo indicador o de detección. Por lo demás, E puede presentar grandes variaciones de tamaño y estructura. En una realización, E tiene un peso molecular de entre 50 y unos 2500 Dalton, y más preferiblemente de entre 50 y unos 1500 Dalton. 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 a efectos de la detección. Preferiblemente, el grupo de detección genera una señal fluorescente.  
55

60 Las etiquetas moleculares dentro de una pluralidad se seleccionan de forma que cada una disponga de una característica de separación única y/o una propiedad óptica única con respecto a los demás

miembros de la misma pluralidad. En un aspecto, la característica de separación electroforética o cromatográfica es el tiempo de retención en un conjunto 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 electroforética. En otra realización, la propiedad óptica es una propiedad de fluorescencia, como un espectro de emisión, una duración de la fluorescencia o la intensidad de la fluorescencia a una longitud de onda o banda de longitudes de onda concreta. Preferiblemente, la propiedad de fluorescencia es la intensidad de la fluorescencia. Una o dos o más de las etiquetas moleculares de una pluralidad pueden tener tiempos de migración o retención idénticos, pero tendrán propiedades fluorescentes únicas, por ejemplo, espectros de emisión espectralmente solubles, de forma que todos los miembros de la pluralidad se puedan distinguir mediante la combinación de la medición de la fluorescencia y la separación molecular.

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 tienen unas propiedades de fluorescencia sustancialmente idénticas tienen diferentes movilidades electroforéticas de manera que se forman distintos picos en un electroferograma en condiciones de separación. Preferiblemente, las pluralidades de etiquetas moleculares de la invención se separan mediante un aparato convencional de electroforesis capilar, en presencia o ausencia de una matriz de cribado convencional. Durante la separación electroforética o después, las etiquetas moleculares son detectadas o identificadas por el registro de señales de fluorescencia y los tiempos de migración (o distancias de migración) de los compuestos separados o elaborando un gráfico de fluorescencia relativa y orden de migración de las etiquetas moleculares (por ejemplo, como un electroferograma). Preferiblemente, la presencia, ausencia y/o cantidades de etiquetas moleculares se miden utilizando uno o más parámetros.

Una fracción inductora del clivaje o agente de clivaje es un grupo que produce una especie activa que es capaz de clivar un ligamiento clivable, preferiblemente por oxidación. Preferiblemente, la especie activa es una especie química que muestra una actividad efímera, por lo que los efectos inductores del clivaje se producen únicamente en las proximidades del sitio en el que se genera. O bien la especie activa es inherentemente efímera, de forma que no genere un fondo significativo más allá de la proximidad de su creación, o se utiliza un fagocito que elimine de forma eficiente la especie activa, para que no pueda reaccionar con los ligamientos clivables más allá de una corta distancia desde el sitio en el que se ha generado. Entre los ejemplos de especies activas se incluyen oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno, NADH y radicales hidroxilo, radicales fenoxi, superóxido y similares. Entre los ejemplos de inhibidores para las especies activas que causan oxidación se incluyen polienos, carotenoides, vitamina E, vitamina C, aminoácido-pirrol N-conjugados de tirosina, histidina y glutatona. Véase, *por ejemplo*, Beutner *et al.*, 2000, *Meth. Enzymol.* 319:226-241.

Una consideración a la hora de diseñar ensayos que emplean una fracción inductora del clivaje y un ligamiento clivable es que estos no estén muy alejados entre sí cuando se unen a un complejo receptor que la especie activa ha generado, dado que la fracción inductora del clivaje no podrá clivar de forma eficiente el ligamiento clivable. En un aspecto, los ligamientos clivables se encuentran preferiblemente a unos 1000 nm y preferiblemente a unos 20-200 nm de una fracción inductora del clivaje del ligamiento. Más preferiblemente en el caso de las fracciones inductoras del clivaje por fotosensibilizador que generan oxígeno singlete, los ligamientos clivables se encuentran a unos 20-100 nm de un fotosensibilizador en un complejo receptor. Un experto en la técnica reconocerá que la proximidad efectiva de un sensibilizador concreto podrá depender de los detalles de un diseño de ensayo particular y se podrá determinar o modificar con la experimentación rutinaria.

Un sensibilizador es un compuesto que se puede inducir para que genere una especie o intermediario reactivo, normalmente oxígeno singlete. Preferiblemente, un sensibilizador utilizado según la invención es un fotosensibilizador. Otros sensibilizadores incluidos en el ámbito de aplicación de la invención son compuestos que al ser excitados por calor, luz, radiación ionizante o activación química liberarán una molécula de oxígeno singlete. Los miembros más conocidos de esta clase de compuestos incluyen endoperóxidos como 1,4-biscarboxietil-1,4-naftaleno endoperóxido, 9,10- difenilantraceno-9,10-endoperóxido y 5,6,11,12-tetrafenil naftaleno 5,12- endoperóxido. El calentamiento o la absorción directa de luz por parte de estos compuestos libera oxígeno singlete. Otros sensibilizadores son divulgados por Di Mascio *et al.*, 1994, *FEBS Lett.* 355:287 y Kanofsky, 1983, *J.Biol. Chem.* 258:5991-5993; Pierlot *et al.*, 2000, *Meth. Enzymol.* 319:3-20.

Los fotosensibilizadores se pueden unir de forma directa o indirecta, a través de ligamientos covalentes o no covalentes, a los anticuerpos. Las orientaciones para producir estas composiciones se encuentran disponibles en la bibliografía, por ejemplo en los ámbitos de la terapia fotodinámica, inmunodiagnósticos y similares. Algunos ejemplos de orientaciones se pueden encontrar 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 USA n.º 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 para generar oxígeno singlete. Se pueden utilizar tanto fuentes policromáticas como monocromáticas siempre que la fuente sea lo suficientemente intensa como para producir suficiente oxígeno singlete en un plazo de

tiempo práctico. La duración de la radiación depende de la naturaleza del fotosensibilizador, la naturaleza del ligamiento clivable, la potencia de la fuente de radiación y su distancia de la muestra. En general, el periodo de radiación puede ser aproximadamente desde menos de un microsegundo hasta unos 10 minutos, normalmente en el rango aproximado de entre un milisegundo y 60 segundos. La intensidad y la duración de la radiación deberían ser suficientes para excitar al menos el 0,1% de las moléculas del fotosensibilizador, normalmente al menos aproximadamente un 30% de las moléculas del fotosensibilizador y preferiblemente, casi todas las moléculas del fotosensibilizador. Entre los ejemplos de fuentes de luz se incluyen láseres como, por ejemplo, láseres de helio-neón, láseres de argón, láseres YAG, láseres de He/Cd y láseres de rubí; fotodiodos, lámparas de mercurio, sodio y vapor de xenón; lámparas incandescentes, como lámparas de tungsteno y tungsteno/halógenas y lámparas de destellos. Un ejemplo de dispositivo de fotoactivación adecuado para el uso en los métodos de esta invención se divulga en la Publicación de Patente Internacional n.º WO 03/051669. En estas realizaciones, el dispositivo de fotoactivación es un conjunto de diodos emisores de luz (LED) montados en una carcasa que permiten la iluminación simultánea de todos los pocillos de una placa de 96 pocillos.

Entre los ejemplos de fotosensibilizadores que se pueden utilizar en la presente invención se encuentran aquellos que presentan las mencionadas propiedades y los divulgados en las Patentes USA n.º 5 536 834, 5 763 602, 5 565 552, 5 709 994, 5 340 716, 5 516 636, 6 251 581, y 6 001 673; la Solicitud de Patente Europea publicada n.º 0484027; Martin *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 186:635-645 y Yarmush *et al.*, 1993, *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.* 10:197-252. Como ocurre con los sensibilizadores, en determinadas realizaciones un fotosensibilizador puede estar asociado con un soporte en fase sólida unido de forma covalente o no covalente a superficie del soporte o incorporado en el cuerpo del soporte. En general, el fotosensibilizador está asociado con el soporte en una cantidad necesaria para conseguir la cantidad necesaria de oxígeno singlete.

Por lo general, la cantidad de fotosensibilizador se determina empíricamente a través de métodos rutinarios. Tras el clivaje, la muestra se puede analizar para determinar la identidad de las etiquetas moleculares que se han liberado. Cuando se utiliza un ensayo se emplea una pluralidad de compuestos de unión, por lo general la separación de las etiquetas moleculares precede a su detección. Los métodos para la separación y la detección se determinan en el proceso de diseño de las etiquetas moleculares para el ensayo. Un modo preferible de separación emplea electroforesis, en el que las diversas etiquetas se separan basándose en diferencias conocidas de sus movilidades electroforéticas.

En un cuarto aspecto, la divulgación describe un anticuerpo purificado que se une a p95. En una realización preferible, el anticuerpo purificado se une específicamente a p95. El anticuerpo se une específicamente al dominio extracelular de p95 pero no a HER2 de longitud completa. 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 de la divulgación, el anticuerpo se ha presentado ante uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. En una realización preferible de la divulgación, la invención se refiere a uno de los péptidos que tienen las SEC. ID. N.º 1-7. El anticuerpo es o comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). En una realización, el anticuerpo es p95.D9.1.

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

Los expertos en la técnica apreciarán que la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo o péptido se puede modificar y que puede resultar recomendable introducir modificaciones para mejorar las propiedades del anticuerpo para su uso terapéutico, analítico o de diagnóstico. Por otra parte, se apreciará que uno o más aminoácidos de estos anticuerpos se pueden cambiar mediante inserción, delección o sustitución, sin reducir de forma significativa las características de unión del anticuerpo. Algunos ejemplos de cambios de aminoácidos serían sustituciones utilizando aminoácidos con características moleculares similares (es decir, sustituciones conservadoras, por ejemplo cambio de aminoácidos desde los siguientes subgrupos de aminoácidos aromáticos, aminoácidos ácidos, aminoácidos básicos o aminoácidos con amidas o azufres) Se pueden realizar otras sustituciones no conservadoras o inserciones sin alterar de forma apreciable la integridad molecular o las características de unión. Por otra parte, algunos cambios de aminoácidos o series de cambios de aminoácidos mejorarán las propiedades del anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, una mejor afinidad de unión, una mayor estabilidad (por ejemplo, resistencia a proteasas) y/o facilidad de producción. Los métodos para cambiar las secuencias de aminoácidos y/o seleccionar moléculas con mejores propiedades son conocidos por los expertos en la técnica. Preferiblemente, en anticuerpos o péptidos 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%. Cada uno de estos anticuerpos o péptidos están diseñados para encontrarse dentro del alcance de la invención contemplada.

En una realización preferible, se pueden utilizar anticuerpos dirigidos a p95 o péptidos para desarrollar

moléculas adicionales dirigidas a p95. Las modificaciones de los anticuerpos descritos en el presente pueden resultar deseables para mejorar las cualidades, incluyendo, por ejemplo, mejora de la función, reducción de la inmunogenicidad, aumento de la estabilidad, mejora de las propiedades farmacológicas, como la vida útil en suero, y mayor facilidad y rendimiento de la producción. Se pretende que cada una de estas moléculas dirigidas se encuentre dentro del alcance de la invención contemplada.

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 (ATCC n.º PTA-9738, PTA-9739 y PTA-9740) en un marco humano para aplicaciones terapéuticas. Se han documentado diversos métodos para humanizar anticuerpos (véase Jones et al. (1986) *Nature* 321:522-525, Riechmann et al. (1988) *Nature* 332:323-327, Verhoeven et al. (1988) *Science* 239:1534-1536). Típicamente, las secuencias no humanas del dominio variable se rastrean por ordenador dentro del repertorio completo de secuencias humanas del dominio variable de cadena ligera y pesada para encontrar las secuencias marco variables de origen humano más cercanas a las secuencias de roedores (véase Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296-2308, Chothia et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 186:901-917). Alternativamente, 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.* 151:2623-202632). En una realización, el diseño asistido por ordenador se utiliza para seleccionar secuencias que confieren estabilidad y conservan o mejoran las características de unión. Cada una de ellas está diseñada para encontrarse dentro del alcance de la invención contemplada.

En otra realización, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos se pueden utilizar para crear moléculas de unión dirigidas que se unen al mismo epítipo en p95 pero se encuentran 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 los que el marco puede ser una parte de un anticuerpo, por ejemplo un fragmento scFv o F(ab')<sub>2</sub> (véase WO 93/16185 y Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163-167, respectivamente). Un experto en la técnica podrá apreciar también que una proteína completamente no relacionada (como beta-lactamasa bacteriana) puede presentar convenientemente el dominio o dominios de unión para formar un compuesto de unión. En este sentido, se pretende que los anticuerpos no relacionados, definidos en el presente, se encuentren incluidos en el alcance de la invención.

El anticuerpo puede actuar terapéuticamente solo mediante unión o a través de otras propiedades (por ejemplo, actividad enzimática o cabezas tóxicas). En una realización, la proteína dirigida puede ser modificada para ejercer un efecto terapéutico o un efecto terapéutico mayor a través de la citotoxicidad mediada por células y dependiente de antígeno (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). En otra realización, se pueden conjugar toxinas con el anticuerpo o la proteína dirigida. Entre los ejemplos de toxinas de moléculas pequeñas se incluyen, por ejemplo, maitansina, caliqueamicina y CC-1065 (véase, por ejemplo, Carter y Senter (2008) *Cancer J.* 14:154-169).

Por otra parte, se pueden unir radioetiquetas a anticuerpos para crear terapéuticos dirigidos. Las toxinas también pueden estar unidas a proteínas dirigidas e incluyen, entre otras, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas*, abrina y ricina (véase Kreitman (2006) *AAPSJ.* 18:E532-551).

En otra realización, los anticuerpos dirigidos (o fragmentos de estos) se pueden fusionar con enzimas para su uso en la terapia con profármacos-enzimas dirigida a anticuerpos (ADEPT; véase Bagshawe (1987) *Br. 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 dirigidas se pueden fusionar con moléculas como polietilenglicol, que mejoran las propiedades farmacológicas, como la vida media en suero (véase Harris y Chess (2003) *Nat. Rev. Drug Discov.* 2:214-221).

En un quinto aspecto, la divulgación describe un método para determinar si es probable que un sujeto que padece un cáncer responda al tratamiento con una terapia dirigida, para predecir la evolución de la enfermedad y/o para predecir la probabilidad de un evento significativo en la evolución del cáncer del sujeto basándose en la medición de una cantidad de p95 o de un complejo de p95 en una muestra utilizando los anticuerpos de las reivindicaciones 1 a 3. En una realización, la invención se refiere a un método para determinar si es probable que un sujeto que padece un cáncer responda al tratamiento con un agente que actúa sobre Her-2. En otra realización de la divulgación, la invención se refiere a un método para predecir la evolución de una enfermedad en un sujeto con cáncer. En otra realización de la divulgación, la invención se refiere a un método para predecir la probabilidad de un evento significativo en un sujeto con cáncer.

En una realización preferible de la divulgación, la evolución se mide determinando el tiempo transcurrido entre eventos significativos en el transcurso de la enfermedad de un paciente, donde la medición es predictiva de si un paciente tendrá una evolución prolongada. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la enfermedad metastásica. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión del diagnóstico primario hasta la recidiva. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la cirugía hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la cirugía hasta la recidiva. En una realización

preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la cirugía hasta la metástasis. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la enfermedad metastásica hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la enfermedad metastásica hasta la recidiva. En una realización preferible de la divulgación, el evento significativo es la progresión de la recidiva hasta la muerte. En una realización preferible de la divulgación, la evolución se mide con respecto a la tasa de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o el uso de RECIST.

No todos los tumores Her2-positivos responden a trastuzumab y otros agentes terapéuticos que se unen a epítomos del dominio extracelular de Her2 unido a la membrana. La explicación de la falta de respuesta puede ser que el clivaje del dominio extracelular elimina el sitio de unión para trastuzumab y agentes terapéuticos similares, y deja p95 con una actividad de tirosina quinasa constitutivamente activa. Los altos niveles de Her2 y los niveles relativamente altos de p95, por tanto, pueden ser un marcador significativo para la probabilidad de que un tumor no responda al trastuzumab y otros agentes terapéuticos que se unen a epítomos del dominio extracelular de Her2 unido a la membrana.

En determinadas realizaciones, el método comprende la medición en una muestra biológica del cáncer del sujeto de una cantidad de p95, donde si la cantidad de p95 es baja, entonces es probable que el paciente responda al agente que actúa sobre Her-2 y/o el paciente presente una evolución prolongada. En determinadas realizaciones, la muestra biológica comprende FFPE. En determinadas realizaciones, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama. En determinadas realizaciones, el cáncer de mama es metastásico. En determinadas realizaciones, el agente que actúa sobre Her-2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, el ensayo es el ensayo VeraTag. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta se mide con respecto a la tasa de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o el uso de los criterios RECIST.

En determinadas realizaciones, se crea una medida predeterminada dividiendo las cohortes de pacientes al menos en dos subgrupos de pacientes. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es dos para que la muestra del paciente se divida en un subgrupo de pacientes con p95 alto y un subgrupo con p95 bajo; la cantidad de p95 en el sujeto se compara con el subgrupo alto o el subgrupo bajo; si la cantidad de p95 en el paciente es alta, entonces no es probable que el paciente responda a un agente que actúa sobre Her-2 que no sea un agente que actúa sobre p95 y/o es probable que el paciente presente una evolución corta; si la cantidad de p95 es baja (y la cantidad de Her2 es alta), entonces es probable que el paciente responda a agentes que actúan sobre Her-2 y que la evolución sea prolongada. En determinadas realizaciones, el número de subgrupos es mayor que dos, incluyendo, por ejemplo, tres subgrupos, cuatro subgrupos, cinco subgrupos y seis subgrupos. En determinadas realizaciones, la probabilidad de respuesta o la evolución se mide con respecto a la tasa de supervivencia global, el tiempo hasta la progresión y/o el uso de los criterios RECIST. En determinadas realizaciones preferibles, el agente que actúa sobre Her-2 que no es un agente que actúa sobre p95 es trastuzumab.

En determinadas realizaciones, la medida predeterminada es un límite óptimo. En determinadas realizaciones, la cantidad de p95 en el sujeto se compara con el límite óptimo; si la cantidad de p95 en el paciente es alta, entonces es poco probable que el paciente responda a un agente que actúa sobre Her-2 que no sea un agente que actúa sobre p95 y/o que la evolución del paciente sea corta. Cualquier método conocido por un experto en la técnica que sirva para determinar una cantidad de expresión de p95 puede ser utilizado según la presente invención. Estos métodos pueden incluir cualquier método divulgado en el presente, tales como, por ejemplo, VeraTag, FRET, BRET, complementación biomolecular fluorescente, ensayo de unión por proximidad y amplificación por círculo rodante.

En una realización preferible, el cáncer del sujeto es un cáncer de mama. En una realización preferible, el agente que actúa sobre Her-2 es un inhibidor de la tirosina quinasa y si la cantidad de p95 es elevada, entonces es probable que el paciente responda a la terapia dirigida, es probable que el paciente presente una evolución prolongada y/o es poco probable que el paciente padezca un evento significativo. En una realización preferible, la terapia dirigida es un inhibidor, como un inhibidor de la proteasa, y si la cantidad de p95 es elevada, entonces es probable que el paciente responda a la terapia dirigida, es probable que el paciente presente una evolución prolongada y/o es poco probable que el paciente padezca un evento significativo.

En determinadas realizaciones, el agente que actúa sobre Her-2 se selecciona del grupo compuesto por pertuzumab, trastuzumab, canertinib, lapatinib, mubritinib, AEE-788, HKI-272, BIBW-2992 y BMS-599626. Véase, por ejemplo, Spector, 2007, *Breast Cancer Res.* 9:205. En una realización preferible, el agente que actúa sobre Her-2 es trastuzumab (Herceptin®). Véase, por ejemplo, Goldenberg, 1999, *Clin Ther.* 21:309-18; and Shak, 1999, *Semin Oncol.* 26:71-7.

En una realización preferible, el inhibidor inhibe las metaloproteasas incluyendo, entre otras, las metaloproteasas de matriz y/o miembro(s) de la familia ADAM de proteasas. En una realización preferible, el inhibidor inhibe ADAM 10. Se cree que los miembros de la familia ADAM de metaloproteasas median el clivaje de los miembros de la familia erbB; concretamente ADAM 10 (véase Gee et al. (2003) *Breast Cancer Res.* 5:223-224 y Sahin (2004) *J. Cell Biol.* 164:769-779) que se cree que es una fuente importante de actividad de la convertasa de Her2 ECD (véase Liu, PC et. al (2006) *Cancer Biology and*



*Therapy* 6: 657-664) y que es una diana para la intervención terapéutica.

En determinadas realizaciones, al sujeto se le puede administrar una terapia de combinación que incluye trastuzumab. La terapia de combinación puede incluir trastuzumab en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos conocidos por los expertos en la técnica, entre otros (véase, por ejemplo, Romond, EH, *N Engl J Med* (2005) 353(16): 1673. Preferiblemente, el agente quimioterapéutico tiene un mecanismo de acción diferente al de trastuzumab. Entre los ejemplos concretos de agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar en las diversas realizaciones de la invención, incluyendo composiciones farmacéuticas, formas de administración y kits de la invención, se incluyen, entre otros, la citarabina, melfalano, topotecán, fludarabina, etoposido, idarubicina, daunorubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel, y ciclofosfamida.

En otra realización, la divulgación proporciona un método analítico para rastrear candidatos terapéuticos con el fin de determinar su potencial eficacia como agentes terapéuticos. En una realización preferible, el ensayo VeraTag, descrito en el presente, se puede utilizar para testar los niveles de p95 en sistemas biológicos (o derivados de estos, como líneas celulares) que han sido tratados con inhibidores putativos de enzimas (por ejemplo, convertasas) que se cree que participan en la promoción del crecimiento de tumores dependientes de p95. Los candidatos con actividad inhibidora presentarán niveles reducidos de p95 en el ensayo VeraTag descrito en el presente. En una realización preferible, las enzimas a las que están dirigidos los inhibidores putativos son metaloproteasas de matriz. En una realización preferible, las enzimas son miembros de la familia de proteasas ADAM. En una realización preferible, la enzima es ADAM 10.

En otro aspecto, la divulgación proporciona métodos para tratar a un sujeto con cáncer.

En un aspecto, los métodos consisten en determinar que el sujeto padece un cáncer que es probable que responda al tratamiento y/o tenga una evolución prolongada según un método de la invención, y en administrar una cantidad efectiva del compuesto al sujeto como resultado de dicha determinación. En otro aspecto, los métodos consisten en determinar que un sujeto que padece un cáncer es probable que responda al tratamiento según un método de la invención y, a continuación, en recomendar a un profesional médico la opción de tratamiento consistente en administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente. En otra realización, el agente es al menos dos agentes.

### Ejemplos

#### 30 EJEMPLO 1: Generación de vectores de expresión para p95 y HER2 etiquetados

Se produjeron vectores de expresión para p95 (pcDNA6myc/hisA M611-p95) y HER2 de longitud completa (pcDNA6-HER2) utilizando el vector pcDNA6A-myc/his de Invitrogen.

La secuencia de expresión de HER2 incluía una etiqueta de hemaglutinina (HA-tag) (aminoácidos expresados:

35 YPYDVPDYA) dos aminoácidos en sentido descendente del punto de corte de la secuencia líder putativa. Se incluyó un codón de terminación al final de la secuencia de HER2 para prevenir la incorporación de las etiquetas myc/his introducidas en pcDNA6A-myc/his. La secuencia de p95 comenzaba desde Metionina-611, numerada desde la secuencia de aminoácidos de HER2. En sentido ascendente desde Metionina-61 se encontraba la secuencia que codifica la secuencia líder de HER2 más dos aminoácidos seguidos por la misma etiqueta HA de nueve aminoácidos utilizada en el vector de expresión de HER2. No se incluyó un  
40 codón de terminación al final de la secuencia de p95 por lo que las etiquetas myc/his se incluirían en la proteína expresada.

#### EJEMPLO 2: Generación de anticuerpos contra p95

45 Los siguientes anticuerpos monoclonales/hibridomas de la presente invención se describen a continuación:

P95.A3, p95.B1, p95.B2, p95.B3, p95.B4, p95.B5, p95.B6, p95.B7, p95.B8, p95.B9, p95.B10, p95.B11, p95.B12, p95.B13, p95.B14, p95.B15, p95.B16, p95.B19, p95.B20, p95.B21, p95.B23, p95.B24, p95.B25, p95.B26, p95.D2, p95.D3, p95.D4, p95.D5, p95.D6, p95.D7, p95.D8, p95.D9, p95.D10, p95.D11, p95.D12, p95.D13, p95.D102, p95.D111, p95.D112, p95.D115, p95.D117, p95.D119, p95.D120, p95.D121, p95.D123, p95.D125, p95.D126, p95.D127, p95.D128, p95.D129, p95.D131, p95.D132, p95.D133, p95.D134, p95.D135, p95.D137, p95.D139, p95.E1, p95.E2, p95.E3, p95.E4.

Si se ha clonado el anticuerpo monoclonal, se denominará "X.1", por ejemplo el primer clon de p95.D9 se denominará D9.1, el segundo clon de D9 se denominará D9.2, etc. A efectos de la presente invención, cualquier referencia a p95.D9 o D9 incluirá todos los clones, por ejemplo D9.1, D9.2, etc.

55 Se inmunizó a los ratones con péptidos representativos de epítomos que es probable que estén presentes en p95. Los péptidos utilizados para las inmunizaciones fueron:

Péptido P95.A: ASPLTSIISC

Péptido P95.B: PAEQRASPLTSIISC

Péptido P95.D: MPIWKFPDEEGAC

Péptido P95.F: PSGVKPDLSPYMPIWK

Los péptidos se conjugaron con hemocianina de lapa californiana (KLH) para las inmunizaciones y albúmina de suero bovino (BSA) para el screening, utilizando química SMCC (Pierce, Rockford, IL).

5 Los ratones (Balb/c, FVB, C3H, o CD-1) se inmunizaron con conjugados de péptidos-KLH dos veces a la semana durante cinco semanas para generar MABs anti-p95 capaces de unirse a p95 en fluidos corporales y en la superficie de una célula. Las inmunizaciones se realizaron por vía intradérmica en las dos patas traseras con 10 µg de conjugado péptido-KLH. Los conjugados de péptido-KLH se mezclaron con adyuvantes apropiados antes de la inyección. Se utilizó Titermax (Sigma, St. Louis, MO) para la  
10 primera inyección y Adju-Phos (Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY) para las inyecciones 2 a 9. Para la décima inyección se mezcló antígeno con PBS.

Cuatro días después de la inmunización final, se aislaron los linfocitos de los nódulos linfáticos popliteos y se immortalizaron por electrofusión (generador de electrofusión ECM2001; Harvard Apparatus, Holliston, ME) con la línea celular del mieloma continua P3x63Ag8.653 (Kearney, JF et al. (1979) J Immunology  
15 123, 1548-1550). Las células fusionadas se seleccionaron mediante cultivo en medio de selección (DMEM/15% FBS) que contenía 2,85 µM de Azaserina, 50 µM de Hipoxantina (HA) (Sigma) o 50 µM de Hipoxantina, 0,2 µM de Aminopterina, 8 µM de Timidina (HAT) (Sigma) suplementado con IL-6 humana recombinante (Sigma) a 0,5 ng/mL. Los cultivos se pasaron al medio (DMEM/10% FBS) sin selección y los suplementos de IL-6 para una expansión continuada y la producción de anticuerpos.

20 Los supernatantes del hibridoma se rastrearon por inmunoensayo en fase sólida ligado a enzimas (ELISA), citometría de flujo y inmunoblot, para determinar la reactividad frente a p95. Los cultivos monoclonales se establecieron tras el procedimiento de screening mediante la clasificación de una sola célula utilizando la citometría de flujo.

Los supernatantes del hibridoma se rastrearon mediante ELISA directo utilizando 100 ng de conjugado péptido-BSA o proteína de fusión de Her2-Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN) por pocillo como antígeno (Tabla 1). Her2-Fc es una proteína recombinante que contiene el dominio extracelular de Her2 fusionado con el dominio Fc de la IgG humana. Los anticuerpos A3, B1, B2, B3, B4, B10, B11, B12, B13, B14, B15, B20, B21, B23, E1, E2, E3 y E4 reaccionaron con los péptidos p95.A y p95.B, y no se unieron a 2-Fc. Los anticuerpos B5, B6, B8, B9, B16, B24, B25 y B26 reaccionaron con el péptido p95.B, pero no se unieron al péptido p95.A y Her2-Fc. Los anticuerpos B7 y B19 se unieron a los dos péptidos p95 .A y p95 .B, pero la unión a p95 .A fue mucho más débil que la unión a p95.B. Los anticuerpos D3, D5, D7, D10, D11, D13, D102, D120, D125, D126, D129, D131, D132, D133, D134 y D139 se unieron al péptido p95.D, y no se unieron a Her2-Fc. Los anticuerpos D2, D8, D9, D111, D115, D117, D119, D121, D123, D127, D128, D135 y D137 se unieron con fuerza al péptido p95.D y de forma débil a Her2-Fc. Los anticuerpos D4, D6 y  
35 D12 se unieron con fuerza tanto al péptido p95.D como a Her2-Fc.

La Tabla 1 muestra el screening de medios acondicionados de los hibridomas mediante ELISA directo. Los pocillos se recubrieron con 100 ng de antígeno (péptidos p95.A, p95.B, p95.D, un péptido de control negativo no relacionado en la secuencia con Her2, o proteína recombinante Her2-Fc) y se sometieron a una sonda con supernatantes de hibridomas. La proteína Her2-Fc, que contiene el dominio extracelular (ECD) de Her2, se obtuvo de R&D Systems como proteína quimérica fusionada con la región Fc de la IgG1 humana. El anticuerpo unido se detectó con un antisuero de IgG de cabra anti-murino conjugado con fosfatasa alcalina. Se recogieron los valores OD para el supernatante de los hibridomas/pares de antígenos.  
40

**TABLA 1**

Supernatante del hibridoma	Péptido p95.A	Péptido p95.B	Péptido p95.D	Proteína Her2 Fc	Péptido de control
A3	1,393	2,027		0,131	0,118
B1	2,753	3,495		0,096	0,119
B2	1,912	2,053		0,089	0,122
B3	0,913	0,928		0,085	0,132
B4	1,835	2,482		0,103	0,143
B5	0,121	0,667		0,108	0,132
B6	0,115	2,915		0,109	0,13
B7	0,358	3,251		0,107	0,135
B8	0,11	0,995		0,108	0,134
B9	0,091	3,777		0,092	0,116

ES 2 637 411 T3

B10	2,212	3,03		0,095	0,115
B11	1,553	1,916		0,092	0,118
B12	2,491	2,941		0,104	0,119
B13	1,495	1,679		0,122	0,144
B14	3,693	3,858		0,129	0,14
B15	0,29	0,345		0,102	0,129
B16	0,108	1,78		0,097	0,124
B19	0,238	0,693		0,092	0,103
B20	0,447	0,855		0,102	0,114
B21	0,515	0,7		0,109	0,124
B23	2,95	3,625		0,1	0,118
B24	0,112	3,447		0,1	0,117
B25	0,089	1,556		0,093	0,104
B26	0,088	2,791		0,094	0,102
E1	3,7206	3,8345		0,1101	0,1102
E2	1,3195	1,8344		0,1023	0,0983
E3	2,7201	2,4782		0,1115	0,1106
E4	1,9273	1,9121		0,1168	0,1180
D2			1,4276	0,2555	0,0762
D3			2,3055	0,0890	0,1336
D4			3,9405	1,6825	0,1070
D5			3,4171	0,0939	0,1080
D6			0,9020	1,7200	0,0861
D7			2,0873	0,1152	0,0932
D8			3,7010	0,2191	0,0835
D9			3,4600	0,3109	0,0837
D10			3,1198	0,0865	0,0944
D11			3,3918	0,1026	0,0814
D12			3,8707	4,0000	0,0921
D13			1,1890	0,0923	0,0956
D102			3,6168	0,0968	0,0925
D111			4,0000	0,6007	0,1107
D112			0,3247	0,4424	0,1043
D115			3,9346	0,4967	0,0932
D117			4,0000	0,5348	0,0930
D119			4,0000	0,5448	0,1078
D120			0,6196	0,1175	0,1138
D121			3,7442	0,3166	0,1095
D123			3,7323	0,3121	0,0899
D125			3,8027	0,0943	0,0934
D126			3,6641	0,0920	0,0913
D127			4,0000	0,4784	0,0858
D128			4,0000	0,4525	0,0984
D129			4,0000	0,1230	0,1074
D131			0,4459	0,1210	0,1077
D132			2,6356	0,1155	0,1059
D133			3,9921	0,0954	0,0810
D134			3,7527	0,0934	0,1237

ES 2 637 411 T3

D135			2,5440	0,2019	0,0841
D137			4,0000	0,3294	0,1063
D139			3,5412	0,1102	0,1096

Varios clones mostraron reactividad al péptido y escasa o ninguna reactividad a HER2- ECD (D3, D5, D7-11 y D13 de la Figura 1). Otros mostraron reactividad tanto a HER2-ECD como al péptido de inmunización (D4, D6 y D12 de la Figura 1).

5 También se utilizaron medios acondicionados de clones para teñir transferencias de geles de poliacrilamida realizadas con lisados de SKBR3, 293T y 293T transfectadas con pcDNA6myc/hisA M61 l-p95 (véase la Figura 2). Se separaron 5 ug de lisado celular de células SKBR3 y 293T o 1 ug de lisado celular de las células transfectadas con el vector de expresión de pcDNA6myc/hisA M61 l-p95 en geles NuPAGE al 4- 12% (Invitrogen). Los geles se colocaron en membranas PVDF cubiertas de medios  
10 acondicionados de hibridomas D4, D8, D12 o Her2 Ab8. Her2 Ab8 (Labvision, Fremont, CA) se utilizó como anticuerpo de control positivo y se une a un epitopo intracelular de Her2 que también forma parte de p95. Los anticuerpos unidos se detectaron con un antisuero anti-IgG murina conjugado con peroxidasa de rábano y un reactivo ECL. En los inmunoblots, solo D4, D8 y D12 mostraron una unión significativa, reconociendo tanto Her2 de longitud completa (en lisados celulares de SKBR3) como p95 (en lisados  
15 celulares de células 293T transfectadas con vectores de expresión de p95).

Los anticuerpos A3, D3, D5, D6, D7, D9, D10, D11, D13 y todos los anticuerpos B y E no produjeron señales específicas en inmunoblots (datos no mostrados). Se incluyó Anti-HER2 Ab8 de Labvision como control positivo (véase la Figura 2).

20 Los supernatantes de hibridomas se rastrearon mediante citometría de flujo utilizando células HEK293F transfectadas transitoriamente con Her2 de longitud completa etiquetado con HA o PcDNA6-p95 etiquetado con HA. Las células 293F se transfectaron utilizando 293-fectin (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se incubaron durante dos días. Las células se utilizaron directamente para la tinción o se fijaron con paraformaldehído antes de la tinción. Se añadieron los supernatantes de los hibridomas a las células. Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando un suero de IgG anti-murino biotinilado y estreptavidina-  
25 ficoeritrina (células nativas; Tabla 2, Figura 3a) o un suero de IgG anti-murino conjugado con fluoresceína (células fijadas; Tabla 3, Figura 3b).

Los anticuerpos se podrían agrupar en líneas generales en dos clases, en base a la unión a células 293 con expresión de p95 o HER2. Los anticuerpos A3, D3, D5, D6, D7, D10 y D11 se unieron a células nativas con expresión de pcDNA6-p95, pero no se unieron a células con expresión de Her2 de longitud completa. Los anticuerpos D4, D8, D9 y D12 se unieron a células nativas con expresión de pcDNA6-p95 y a células nativas con expresión de Her2 de longitud completa. A pesar de que Her2 de longitud completa fue reconocido por estos anticuerpos, la unión fue relativamente débil en comparación con los anticuerpos de control positivo HA.A28.2.

35 La tabla 2 muestra el screening de supernatantes de hibridomas mediante citometría de flujo con células nativas. Las células 293F transfectadas con HA-Her2 o pcDNA6-p95 o células 293F de control se tiñeron con supernatantes de hibridomas. Se recogen las medias de las intensidades de fluorescencia (MFI), los porcentajes de células teñidas y los ratios de MFI. El ratio de MFI es el ratio de la MFI del supernatante de un hibridoma específico y la MFI del anticuerpo de control negativo anti-ricina. El anticuerpo HA.A28.2 específico para la etiqueta de HA (HA-tag) se utilizó como control positivo.

40

**Tabla 2**

Muestras	293F HA-Her2			293F pcDNA6-095			Control 293F		
	MFI	% células teñidas	Ratio MFI	MFI	% células teñidas	Ratio MFI	MFI	% células teñidas	Ratio MFI
Anti-ricina	0,29	0,8%	1,0	0,24	0,9%	1,0	0,26	0,9%	1,0
HA.A28.2	19,98	94,3%	68,9	15,79	74,4%	65,8	0,40	17,7%	1,5
A3	0,39	1,7%	1,3	6,83	53,5%	28,5	0,31	1,6%	1,2
D3	0,36	5,8%	1,2	24,15	83,6%	100,6	0,27	1,3%	1,0
D4	2,80	80,0%	9,7	26,88	88,5%	112,0	0,33	11,0%	1,3
D5	0,26	0,5%	0,9	1,19	35,3%	5,0	0,27	2,5%	1,0
D6	0,32	2,6%	1,1	0,50	26,6%	2,1	0,26	1,7%	1,0
D7	0,44	10,7%	1,5	7,90	65,6%	32,9	0,34	15,1%	1,3
D8	3,16	61,9%	10,9	26,58	81,3%	110,8	0,28	3,6%	1,1
D9	3,37	48,1%	11,6	22,89	76,8%	95,4	0,28	3,2%	1,1

## ES 2 637 411 T3

D10	0,30	3,2%	1,0	16,28	73,7%	67,8	0,25	1,2%	1,0
D11	0,40	5,7%	1,4	7,22	60,5%	30,1	0,27	2,2%	1,0
D12	3,17	83,6%	10,9	24,17	85,3%	100,7	0,45	35,4%	1,7
D13	0,26	0,2%	0,9	0,24	0,6%	1,0	0,27	1,6%	1,0

Los anticuerpos A3, D5, D6, D7, D11 y D13 no se unieron a las células 293F fijadas con formalina que expresan pcDNA6-p95 lo que indica que el procedimiento de fijación modificó los epítomos reconocidos por estos anticuerpos. Los anticuerpos D4 y D12 se unieron bien a las células 293F fijadas que expresan pcDNA6-p95 o Her2. Los anticuerpos D3, D8, D9 y D10 se unieron bien a las células 293F fijadas que expresan pcDNA6-p95, pero no se unieron o se unieron con poca fuerza a las células fijadas que expresan Her2.

La tabla 3 muestra el screening de supernatantes de hibridomas mediante citometría de flujo con células fijadas con formalina. Las células 293F transfectadas con HA-Her2 o pcDNA6-p95 o células 293F de control se fijaron con formalina y se tiñeron con supernatantes de hibridomas. Se recogen las medias de las intensidades de fluorescencia (MFI), los porcentajes de células teñidas y los ratios de MFI. El ratio de MFI es el ratio de la MFI del supernatante de un hibridoma específico y la MFI del anticuerpo de control negativo anti-ricina. El anticuerpo HA.A28.2 específico para la etiqueta de HA (HA-tag) se utilizó como control positivo.

**Tabla 3**

Muestras	293F HA-Her2			293F pcDNA5-p95			Control 293F		
	MFI	% células	Ratio MFI	MFI	% células	Ratio MFI	MFI	% células	Ratio MFI
Anti-ricina	0,48	1,0%	1,0	0,48	0,9%	1,0	0,43	0,9%	1,0
HA.A28.2	2,12	60,8%	4,4	1,96	36,6%	4,1	0,56	12,3%	1,3
D3	0,54	4,2%	1,1	1,49	27,4%	3,1	0,47	3,2%	1,1
D4	1,21	35,2%	2,5	2,24	38,4%	4,7	0,49	6,3%	1,1
D5	0,33	0,3%	0,7	0,36	1,8%	0,8	0,29	0,2%	0,7
D6	0,33	0,1%	0,7	0,33	0,2%	0,7	0,29	0,1%	0,7
D7	0,42	0,6%	0,9	0,50	6,6%	1,0	0,40	0,8%	0,9
D8	0,79	21,0%	1,6	2,07	32,6%	4,3	0,43	1,8%	1,0
D9	0,71	18,4%	1,5	2,08	32,1%	4,3	0,34	0,3%	0,8
D10	0,48	1,7%	1,0	1,47	29,7%	3,1	0,31	0,1%	0,7
D11	0,42	1,9%	0,9	0,55	12,6%	1,1	0,36	0,3%	0,8
D12	0,99	27,1%	2,1	2,00	32,3%	4,2	0,33	0,2%	0,8
D13	0,43	2,4%	0,9	0,58	0,9%	1,2	0,30	0,1%	0,7
Anti-ricina	0,48	1,0%	1,0	0,48	0,9%	1,0	0,43	0,9%	1,0

### **EJEMPLO 3: Producción de portaobjetos FFPE de líneas celulares con y sin expresión del transgen de p95**

Se compraron tres líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, MDA-MB-453 y SKBR-3, a American Type Cell Culture Collection. MCF-7-p95c (donde "c" indica una línea clonal), MCF7-HER2c y SKBR3-p95c se obtuvieron del laboratorio de Jose Baselga. Estos clones se produjeron de forma ligeramente diferente del p95 que no contiene ninguna secuencia líder ni HA-tag, como se describe en Anido *et al.* (2006) *EMBOJ.* 25:13, 3234. Las líneas celulares que contienen p95 se generaron mediante la transfección de células madre MCF7 o SKBR3 con un vector de expresión que contiene un fragmento HindIII de HER2 de longitud completa que permite el inicio de la traducción desde varias metioninas internas, incluyendo Met611. MCF-7, MCF7-p95c, MCF7-HER2c y SKBR3-p95c se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> en 50:50 de medio Eagle modificado (DMEM) de Dulbecco: F12, 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina-estreptomicina (PS), 10 µg/mL de insulina bovina y 2 mM de L-glutamina. MDA-MB-453 y SKBR-3 se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub> en 50:50 DMEM: F12, 10% FBS, 1% PS y 2 mM L-glutamina. Las células se colocaron en placas con una densidad de 30 millones por 500 cm<sup>2</sup>. Las células destinadas a la transfección transitoria se dejaron unir durante cuatro horas. Las células se transfectaron con Eugene HD (Roche) conforme a las instrucciones del fabricante. Los medios de cultivo se cambiaron después de un día y las células se fijaron el día 2. Tras retirar el medio, las células se lavaron una vez con 50 mL de D-PBS frío (Invitrogen) y se fijaron con 50 mL de 10% NBF (tampón neutro de formalina). Las células se dejaron en una sala fría a 4 °C durante 30 minutos y se rasparon de las placas de cultivo. El líquido celular se recogió en tubos de centrifugación de 50 mL y se transformó en perlas a 3200xg durante 15 min. Las perlas de células se transfirieron a un aro de goma, se envolvieron

con papel de filtro y se colocaron en un cassette de procesamiento. Para el procesamiento se utilizó un procesador Automatic Tissue-Tek. Dicho brevemente, las perlas de células se expusieron a concentraciones crecientes de alcohol, Clear-rite (sustituto de xileno) y parafina. Tras el procesamiento, las perlas se introdujeron en un bloque utilizando una estación de integración en parafina. Todos los disolventes utilizados para el procesamiento de las perlas de células se obtuvieron de Richard-Allen Scientific.

Se cortaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor con un micrótopo (LEICA) y se colocaron en portaobjetos de carga positiva (VWR) con el número de serie marcado. Los portaobjetos se secaron al aire durante 30 minutos y a continuación se pasaron al horno a 60°C durante una hora. Todos los portaobjetos de las muestras se guardaron a 4°C para su uso futuro.

A fin de verificar la expresión de transgenes de células transfectadas introducidas en bloques FFPE, se prepararon lisados celulares de las muestras de células extraídas y lisadas inmediatamente antes de añadir NBF como se ha descrito anteriormente. El tampón de la lisis contenía 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 50 mM sodio beta-glicerofosfato, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM EDTA, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepstatina y una tableta de Complete Protease Inhibitor (Roche #1836170) en 10 mL de agua. Las muestras se mezclaron con 2x de tampón Laemmli (Biorad) y se calentaron a 70 °C durante 10 minutos. Por separado, el contenido de proteína se estimó con un ensayo de ácido bicinónico (BCA) (Pierce) conforme a las instrucciones del fabricante. Se cargaron 20 microgramos de proteína por línea en un gel con un gradiente de 4-12% y se procesaron en un tampón basado en MOPS (Invitrogen) a 180v durante aproximadamente una hora. Las bandas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) en tampón de inmunoblots Nu-PAGE (Invitrogen) + 10% de metanol a 45v durante 1,5 horas.

Los inmunoblots de membrana se bloquearon primero con PBST (1% Triton-X100 en PBS) más 3% de leche en polvo desnatada durante 30 con agitación suave. Tras dos lavados de 15 minutos con PBST, los inmunoblots se trataron con 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Ab8 anti-HER2 en PBST más 0,03% de leche en polvo desnatada con agitación suave hasta el día siguiente. Tras dos lavados de 15 minutos con PBST, los inmunoblots se trataron con una disolución de 1:50.000 de anticuerpo de cabra anti-murino unida con peroxidasa de rábano (Pierce #31430) con agitación suave durante 30 minutos. Tras dos lavados de 20 minutos con PBST, los inmunoblots se procesaron con el kit de detección West Dura HRP (Pierce) conforme a las instrucciones del fabricante y se capturaron imágenes en película (Kodak).

La Figura 4 muestra los resultados de un conjunto representativo de células que posteriormente se transfirieron en bloques FFPE y se cortaron en secciones. La línea 1 muestra una pequeña cantidad esperada de material en la región de p95 que no se encuentra en la línea de MCF7 (Anido *et al.* (2006) *EMBO J.* 25:13, 3234). También se observan algunas evidencias de esta débil banda de p95 en la MCF7-HER2 sometida a transfección transitoria de la línea 6, utilizando una mezcla 50:50 en peso de vector de pcDNA6-HER2 y pcDNA6. Las líneas 2-4 muestran la expresión esperada de HER2 de longitud completa y p95 en las líneas clonales. Las células sometidas a ensayo de la Línea 7 se transfectaron con la misma cantidad de pcDNA6-HER2 que las células de la línea 6 pero con pcDNA6myc/hisA M61 I-p95 sustituido por el vector vacío. La línea 8 muestra los resultados de células MCF7 transfectadas con 100% pcDNA6myc/hisA M61 I-p95. La línea 9 muestra las células SKBR3, útiles para la comparación con las líneas 3 y 4. La SKBR3 no transfectada muestra una banda en la región inferior de la región p95, pero no las bandas superiores mostradas en las líneas transfectadas. Esto no se espera, dado que se sabe que SKBR3 desprende cierta cantidad de HER2-ECD (Zabrecky *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:3 1716V).

#### **EJEMPLO 4: Screening de anticuerpos anti-p95 mediante ensayo VeraTag**

El anticuerpo monoclonal Ab8 contra el dominio citoplásmico de HER2 se adquirió en Lab Vision. Se compró un anticuerpo de cabra anti-murino Thermo Scientific (#31164). Se sintetizaron indicadores VeraTag (Pro 125 y Pro 14) y se purificaron de acuerdo con el protocolo descrito anteriormente (véase, por ejemplo, más arriba y la Patente USA 7 105 308). Se produjeron conjugados de anticuerpo-VeraTag y anticuerpo-biotina, es decir Ab8-biotina, anticuerpo de cabra anti-murino-Pro125 anti-p95-Pro125, utilizando sulfo-NHS-LC-LC-biotina (Pierce) como ligante según el protocolo del fabricante y los productos conjugados se purificaron mediante HPLC (Agilent) o columna de desalinización PD-10 (GE).

Se realizó un ensayo de p95 FFPE básicamente como se muestra en la Figura 5a. Las muestras FFPE se desparafinaron/rehidrataron utilizando una serie de disolventes. Dicho brevemente, los portaobjetos se sumergieron secuencialmente en xileno (2x, 5 min), 100% etanol (2x, 5 min), 70% etanol (2x, 5 min) y agua desionizada (2x, 5 min). La recuperación del epítipo inducida por calor de las muestras rehidratadas se realizó en una placa que contenía 250 mL de 1 x tampón Diva (Biocare Medical #DV2004MM) utilizando un horno microondas (Spacemaker II, GE): 3,5 min a potencia 10 y 10 min a potencia 3. Tras enfriar durante una hora a temperatura ambiente, los portaobjetos se enjuagaron seis veces con agua desionizada. Los portaobjetos se secaron parcialmente en una centrifugadora (Tomy PMC-082) modificada para el giro lento. 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 una hora con un tampón de bloqueo que contenía un 10% de suero de cabra (Sigma #S1000) y un 1,5% de suero de albúmina bovina en 1 x PBS. Tras retirar el tampón de bloqueo por aspiración, se añadió una solución que contenía el anticuerpo anti-p95 en tampón de bloqueo a los

portaobjetos y se dejó a 4°C hasta el día siguiente en una cámara humidificada con agitación suave. La concentración de anticuerpo anti-p95 era de 1,0 µg/mL para el screening de múltiples anticuerpos; alternativamente se utilizaron 4 µg/mL de anticuerpo D9.1. La solución de anticuerpos se aspiró y las muestras se lavaron con PBS que contenía 0,25% TritonX-100 durante 5 minutos y, a continuación, con PBS solo durante 5 minutos. Tras la aspiración, se añadieron 50 µL de 1,0 µg/mL de anticuerpo de cabra anti-murino etiquetado con VeraTag en tampón de bloqueo. Se dejó incubar este anticuerpo a temperatura ambiente durante 1,5 horas en una cámara humidificada. A continuación se enjuagó con agua desionizada y después con PBS que contenía 0,25% de TritonX-100 durante 5 minutos. A continuación, se colocaron los portaobjetos en rejillas y se sumergieron en agua desionizada seis veces. Tras la centrifugación de los portaobjetos, se añadieron 100 µL de tampón de captura que contenía 1,0 mM ditiotreitól (DTT), 3 pM fluoresceína y dos marcadores internos CE (MF y ML) en 0,01xPBS sobre secciones de la muestra. Los portaobjetos se incubaron en una cámara humidificada durante dos horas para permitir la liberación de VeraTag. El tampón de captura de cada portaobjetos se transfirió a una placa de 96 pocillos CE, a continuación se diluyó convenientemente (generalmente 10x) en tampón de captura que no contenía DTT. Los indicadores VeraTag liberados de las muestras CE se separaron y detectaron en un instrumento ABB 100 CE (alineamiento capilar de 22 cm, Applied Biosystems) en condición de inyección CE de 6kV y 50 seg. y se procesó durante 650 segundos a 30°C.

La identificación y cuantificación de VeraTag se realizó utilizando el software VeraTag Informer (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente USA n.º 0203408-A1). Para analizar las señales VeraTag en un electroferograma CE sin procesar, se utilizaron dos marcadores internos CE, MF (primer marcador) y ML (último marcador), con el fin de identificar los picos de VeraTag en función de su movilidad electroforética o del tiempo de migración,  $t$ , con respecto a los dos marcadores, es decir  $[t(\text{VeraTag})-t(\text{MF})]/[t(\text{ML})-t(\text{MF})]$ . A continuación, se cuantificaron los picos de VeraTag identificados mediante el cálculo del área pico para cada VeraTag. Para corregir la variabilidad en la recuperación de VeraTag de la sección de tejido, y la variabilidad de la eficiencia de la inyección CE y/o de la sensibilidad de detección en el alineamiento capilar, se incluyó fluoresceína (3 pM) en el tampón de captura (CB) de VeraTag, y se sometió conjuntamente a electroforesis, como control de referencia interno del procesamiento de cada muestra. A continuación se documentó el área de cada pico de VeraTag como área relativa pico (RPA) por normalización de área pico de VeraTag (área pico de VeraTag) frente al pico de fluoresceína interna (área pico de fluoresceína).

Los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) con técnicas estándar.

Dicho brevemente, los portaobjetos se colocaron en rejillas de tinción y se enjuagaron primero con agua corriente. Los portaobjetos se introdujeron serialmente en hematoxilina, clarificador y agente azul durante 45 segundos cada uno, y se enjuagaron con agua corriente después de cada paso. A continuación, los portaobjetos se trataron con un 5% de agua en alcohol (dos soluciones nuevas), después con 100% de alcohol (tres soluciones nuevas) y xileno (tres soluciones nuevas, cinco minutos cada una).

Por último, se aplicó un cubreobjetos para proteger la sección. Las áreas tumorales fueron perfiladas en las secciones teñidas con H&E por un patólogo titulado utilizando un bolígrafo permanente de punta fina. Las áreas de las secciones de los portaobjetos de las líneas celulares se perfilaron de forma similar. Las áreas de los tumores y las áreas de las secciones de las líneas celulares se cuantificaron por captura de imagen en un escáner plano y se analizaron utilizando el software ImagePro (Media Cybernetics).

Los términos de cuantificación final para la proteína diana detectada por el ensayo VeraTag pueden ser RPA para muestras similares con idéntico volumen de CB o  $\text{RPA} \cdot \text{CB vol} / \text{área tumoral}$  para tener en cuenta diferentes cantidades de tumor en los portaobjetos. Por lo general, esto se expresa como  $\text{RPA} \cdot \mu\text{L} / \text{cm}^2$ . La reproducibilidad entre las muestras testadas en diferentes días y distintos días en comparación con la media se muestran en la Figura 5b. La diagonal de cada gráfico indica la correlación perfecta. Para ajustar la variabilidad lote a lote, se incluyen en cada lote múltiples líneas celulares estándar con niveles de señal esperados, con el fin de facilitar la normalización. Los resultados para un rango de líneas celulares transfectadas con diversas cantidades de p95, antes y después de la normalización, para tres operadores diferentes, se muestran en la Figura 5c. La normalización lote a lote se limita a una multiplicación por un único factor para cada lote que consigue los mínimos cuadrados del logaritmo de medición sobre estos parámetros respecto del logaritmo de sus valores esperados. Los valores esperados en cada parámetro se establecen midiendo todos los parámetros (normalmente tres) de un único lote con múltiples réplicas, y las réplicas se aplican a múltiples lotes. Cuando se introducen nuevos lotes de producción de cada parámetro, el nuevo lote se mide con múltiples réplicas frente al conjunto existente de parámetros a fin de determinar un valor esperado asociado con ese lote particular.

Los resultados de una serie de anticuerpos de inmunización de la Serie D se muestran en la Figura 6, en comparación con Ab8 anti-HER2. D4.1 y D12.1 se comportaron en gran medida como Ab8, lo que indica que el epítipo que reconoce estos anticuerpos se detecta igualmente bien en p95 que en HER2 de longitud completa. Sin embargo, D8.1 y D9.1 muestran una señal unas 10 veces más fuerte en las líneas celulares que expresan p95 (MCF7-p95, MCF7-p95c y SKBR3-p95c) que en sus líneas madre (MCF7 y SKBR3), lo que demuestra la especificidad para p95. A pesar de que HER2 de longitud completa contiene la misma secuencia peptídica que p95, los epítopos de al menos D8.1 y D9.1 probablemente se encuentran ocultos en HER2 de longitud completa en formato FFPE. MCF7-HER2c muestra una señal

ligeramente mayor que MCF7, consistente con la pequeña cantidad de p95 que se encuentra en la Figura 4, línea 1.

#### **EJEMPLO 5: Cuantificación de p95 en portaobjetos FFPE de cáncer de mama primario**

5 Se obtuvo un conjunto de 12 tumores de cáncer de mama a través de Asterand (Cohorte A). Estos tumores se seleccionaron por ser claramente HER2-positivos (puntuación Allred de 8) y por proceder de pacientes nódulo positivos. Se sabe que estos dos factores están correlacionados con la positividad en p95. Los tumores fueron preparados por Asterand para que aproximadamente la mitad del tumor e congelara en fresco y la otra mitad se fijara con formalina y después en parafina. Esto permitió la detección de p95 mediante inmunoblot, lo que debería implicar la expresión de p95 en los portaobjetos FFPE cortados de la otra mitad del tumor.

10 La parte congelada de los tumores se sometió a lisado bajo pulverización en nitrógeno líquido con un mortero hasta obtener polvo. Se añadió una cantidad mínima de tampón de lisis en frío (600 uL) y se dejó el mortero sobre hielo durante 30 minutos. El tampón de la lisis contenía 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 50 mM sodio beta-glicerofosfato, 1 mM Na3VO4, 5 mM EDTA, 10 ug/mL pepstatina y una tableta de Complete Protease Inhibitor (Roche #1836170) en 10 mL de agua. La solución se recogió en tubos precongelados y se centrifugó a 4°C durante 20 minutos. Las partes alícuotas se guardaron a -80°C hasta su uso.

15 Una inmunoblot (Figura 7a) teñida con un anticuerpo presentado contra el dominio intracelular de HER2, CB11 (Ventana), puso de manifiesto que diversos tumores expresaban p95 con distintos niveles de expresión. Los tumores 1-3, 5, 7, 8 y 10 se designaron p95-positivos y todos los demás p95-negativos. Los portaobjetos FFPE de los 12 tumores junto con siete parámetros de líneas celulares se testaron en el ensayo que se describe en el Ejemplo 4 utilizando el clon D9.1 (Figura 7b). La distinción entre tumores FFPE p95-positivos y p95-negativos fue prácticamente perfecta (gráfico de la Figura c), especialmente teniendo en cuenta la posibilidad de heterogeneidad entre la porción lisada para el inmunoblot y la fijada para el ensayo de p95 FFPE.

#### **EJEMPLO 6: Demostración de sensibilidad a través de un experimento de control de isotipo**

20 La sensibilidad del ensayo de p95 FFPE también se demostró por la comparación con mediciones de control en las que el anticuerpo D9.1 fue intercambiado por un control de isotipo (Figura 8a). Tanto en el caso de MCF-7 como en el de SKBR3, que expresa elevados niveles de HER2, la señal generada con D9.1 no fue muy diferente de la que se observó cuando D9.1 fue sustituido por un control de isotipo. Por el contrario, cuando p95 está presente (MCF7-p95 transitoria, MCF7-p95 clon y SKBR3-p95), las señales generadas en presencia de D9.1 son muy superiores a las del control de isotipo. En el caso de los tumores, los tumores p95-positivos generaron señales utilizando D9.1 muy superiores a las obtenidas cuando se utilizó el control del isotipo, mientras que en la mayoría de los p95-negativos se obtuvieron señales similares a las generadas cuando D9.1 estaba ausente (Figura 8b). La Figura 8c muestra la diferencia entre las señales generadas utilizando D9.1 y el control de isotipo. La diferencia en las medias entre los p95-positivos y p95-negativos es aproximadamente de 4x con un rango dinámico aproximado de 10x.

#### **EJEMPLO 7: Aumento de la probabilidad de positividad p-95 en muestras medidas claramente HER-2 positivas mediante ensayo HERmark de HER2 total**

30 El ensayo VeraTag de HER2 total (H2T) cuantifica la cantidad de proteína de HER2 por superficie unitaria de tumor invasivo, tal y como se describe en la Solicitud de Patente USA N.º 61/015 608 (Publicación Internacional n.º W02009086197). Dado que se espera que p95 tenga una mayor prevalencia en tumores con las puntuaciones más elevadas de HER2-positivos medidas por IHC o H2T, los tumores utilizados en el Ejemplo 5 fueron testados mediante ensayo H2T a fin de buscar un posible límite. Se observó que los tumores se distribuyen en todo el rango de HER2-positividad conforme al ensayo H2T (Figura 9a), aunque el número de p95-positivos del H2T fue superior al de p95-negativos.

35 Se obtuvo un segundo conjunto de 18 tumores FFPE (Cohorte B) de Asterand para explorar también la distribución de p95 en el ámbito del H2T. Los portaobjetos de estos tumores se sometieron a ensayo de p95, tal y como se describe en el Ejemplo 4, y ensayo H2T. Los resultados correlativos para las Cohortes A y B se presentan en la Figura 9b. Una señal de p95 más alta es más probable que esté asociada con una señal de H2T alta en ambas cohortes.

40 Por tanto, se planteó la hipótesis de que los pacientes tratados con trastuzumab con puntuaciones H2T más consistentes con los tumores p95-positivos medidos en la Cohorte A tendrían peores resultados que aquellos con puntuaciones H2T más bajas, dado que p95 carece del epítipo del trastuzumab y, por tanto, representa un medio de escape probable. Para probar estas hipótesis, se investigó a una cohorte de pacientes tratados con trastuzumab cuyos tumores se habían sometido previamente a ensayo H2T para obtener pruebas de malos resultados en el rango de H2T que se espera que esté enriquecido en p95. Esta cohorte se describe también en la Solicitud de Patente USA 61/015 608 (Publicación Internacional n.º W02009086197). Esta cohorte (N=92) se obtuvo del grupo de estudio Serum Her2/neu Study Group (ISHSG) y se denomina la cohorte Lipton.



Estos pacientes fueron seleccionados inicialmente mediante IHC realizada en una sede central (la Universidad de Viena, Austria) por un único patólogo. El 90% de los pacientes eran IHC3+, y 80/92 recibieron trastuzumab en combinación con quimioterapia, mientras que 12 recibieron trastuzumab como único fármaco. 88/92 pacientes padecían cáncer de mama metastásico y podrían haber recibido trastuzumab como terapia de primera, segunda o tercera línea.

Para estos análisis, se seleccionó un límite de H2T inmediatamente superior al p95-negativo más elevado mostrado en la Figura 9a, con un valor de  $\log_{10}(\text{H2T}) \geq 1,95$ . Por encima de este límite de H2T, los tumores se podrían describir como p95-enriquecidos, mientras que por debajo del límite serían p95-equivocos. Entre los pacientes confirmados como HER2-FISH-positivos por el análisis del laboratorio central, los del grupo p95-enriquecido presentaban un tiempo hasta la progresión significativamente más corto (HR=2,0; p=0,017) que los del grupo p95-equivoco (Figura 9c). Los resultados de supervivencia totales (Figura 9d) fueron similares (HR=1,8; p=0,056). Estos resultados sugieren que una medida altamente cuantitativa de expresión de HER2, como en el ensayo H2T con VeraTag, puede identificar subpoblaciones que se espera que pertenezcan al grupo p95-enriquecido, en pacientes con tumores que contienen p95, hasta el punto de que el trastuzumab sea notablemente menos efectivo. Por tanto, esta subpoblación sería candidata para tratamientos alternativos como los inhibidores de la tirosina quinasa de HER2.

#### **EJEMPLO 8: Inmunohistoquímica colorimétrica de líneas celulares FFPE y tumores con un anticuerpo anti-p95**

Se cultivaron líneas celulares madre o transfectadas con p95-CTF de cáncer de mama SKBR3 o SKBR3-p95c (~  $1 \times 10^6$  p185-HER2/célula), se fijaron con formaldehído y se prepararon para las secciones FFPE tal y como se describe en el Ejemplo 3. La tinción para p95 o HER2 de longitud total se realizó utilizando el kit Vectastain ELITE ABC Peroxidase (PK 6102), el sustrato de peroxidasa ImmPact DAB (Vector #SK4105), y suero de caballo del kit Vectastain. Las células se sometieron a una contratinción con Hematoxilina (Vector #H3401). Las células FFPE en bloques de parafina se cortaron con un micrótopo con un grosor de 5  $\mu\text{m}$  y se colocaron en portaobjetos. El proceso de recuperación del epítipo fue similar al Ejemplo 4. Dicho brevemente, las secciones se desparafinaron con xileno secuencial estándar, 100% de etanol y 70% de extracciones de etanol, y la recuperación del epítipo se realizó en tampón DIVA y se llevó a ebullición en un horno microondas (3,5 min a potencia =10, y 10 min a potencia = 3). Tras enfriar durante una hora, las secciones se lavan seis veces con agua, se bloquean con suero de caballo conteniendo tampón de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente (RT) y, a continuación, se incuban con 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticuerpo monoclonal D9.1 anti-p95 en tampón de bloqueo durante una hora a RT.

Las secciones se lavan con PBS y la adición del anticuerpo secundario y los posteriores pasos de desarrollo del color y tinción con hematoxilina se realizaron tal y como se describe en el protocolo del kit del fabricante. Se tomaron micrografías de las células con un sistema de captura de imágenes por cámara digital montado en un microscopio Leica. Los resultados se muestran en la Figura 10.

La Figura 10a muestra la tinción mediante el anticuerpo D9.1, que reconoce p95, de varias líneas celulares. En las células MCF7 madre, que expresan bajos niveles de Her2, se observaron bajos niveles de tinción. En las células MCF7 transfectadas con un vector de expresión de p95, se observan altos niveles de tinción; sin embargo, en las células transfectadas con vectores de expresión de Her2 de longitud total no se observa tinción, lo que verifica la especificidad del anticuerpo D9.1. En las células SKBR-3 madre, que expresan altas cantidades de HER2 de longitud total y bajos niveles de p95, se observa una escasa tinción de la membrana de la célula, consistente con el bajo nivel de p95; por el contrario, en las células transfectadas con CTF (fragmento C-terminal), que es un dominio intracelular de Her2, se observa una fuerte tinción.

Los experimentos de control que utilizan un anticuerpo de control de isotipo de IgG2a humana en sustitución de D9.1 (isotipo IgG2a) no presentaban la tinción de la membrana de la célula observada con D9.1, lo que indica la especificidad de la tinción de D9 (datos no mostrados).

Los portaobjetos de la Cohorte A descritos en el Ejemplo 5 se utilizaron para testar la capacidad de D9.1 para detectar p95 en tumores FFPE. Tal y como se describe en el Ejemplo 5, el número 5 se identificó como positivo para p95 mediante inmunoblot, mientras que los números 6 y 12 fueron negativos. Las secciones FFPE se examinaron mediante tinción IHC con anticuerpos D9.1 o CB-11 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 8, utilizando el kit Vectastain ELITE ABC Peroxidase (PK 6102). Las células se sometieron a una contratinción con Hematoxilina (Vector #H3401).

La Figura 10b representa la tinción mediante el anticuerpo D9.1, que reconoce p95, del número 5 p95-positivo. Se observa una fuerte tinción de la membrana de la célula, consistente con la expresión de p95 observada en el inmunoblot y el ensayo VeraTag. Una tinción de la membrana igualmente fuerte se observa con CB11, consistente con el alto nivel de expresión de p95 y p185-HER2 que se observa en el inmunoblot y el ensayo VeraTag de HER2. La Figura 10b también muestra la ausencia de tinción de la membrana de la célula por parte del anticuerpo D9.1 aplicado a los tumores número 12 y 6, consistente con la ausencia de p95 determinada por inmunoblot y ensayo VeraTag. Sin embargo, los significativos niveles de HER2 de longitud completa desvelados mediante inmunoblot y ensayo VeraTag con respecto al

número 5 son consistentes con la fuerte tinción de la membrana observada con CB-11, un anticuerpo dirigido al dominio intracelular de Her2. Si se analizan conjuntamente con la tinción de control de la línea celular, los datos confirman los resultados del ensayo VeraTag de p95 que indican una unión preferente del anticuerpo D9.1 con p95 en comparación con HER2 de longitud completa. Por otra parte, los datos sugieren que la secuencia de aminoácidos reconocida por D9.1 se encuentra en formas naturalmente presentes de p95 que se expresan en los cánceres de mama. Los experimentos de control que utilizan un anticuerpo de control de isotipo de IgG2a humana en sustitución de D9.1 (isotipo IgG2a) no presentaban la tinción de la membrana de la célula observada con D9.1, lo que indica la especificidad de la tinción de D9.1 en tejidos tumorales (datos no mostrados).

**EJEMPLO 9: Cuantificación de p95 utilizando anticuerpos anti-p95 directamente etiquetados en un ensayo VeraTag**

En el Ejemplo 4, los niveles de p95 se midieron en portaobjetos FFPE utilizando anticuerpos específicos anti-p95 conjuntamente con un anticuerpo secundario anti-murino etiquetado con vTag clivable. En este ejemplo, los niveles de p95 se midieron con anticuerpos anti-p95 directamente etiquetados. El método de ensayo es idéntico al que se describe en el Ejemplo 4, salvo por el hecho de que omite la adición del secundario etiquetado y el posterior lavado y que se utilizó D9-Pro125 a 1.0 µg/mL. Los resultados presentados en la Figura 11 son similares a los mostrados en la Figura 6 con una posible reducción del rango dinámico entre líneas celulares con niveles bajos/negativos de p95 (MCF7, MCF7-HER2, SKBR3) y las líneas celulares con niveles altos de p95 (MCF7-p95c, MCF7-p95 y SKBR3-p95c). El anticuerpo D9.1 también se utilizó en este formato en un lote de líneas celulares (Figura 12a) y tumores de la Cohorte A (Figura 12b).

**EJEMPLO 10: Cuantificación de p95 utilizando un anticuerpo anti-p95 y un anticuerpo dirigido contra el dominio intracelular de HER2 en un ensayo VeraTag**

En este ejemplo, la especificidad de D9.1 se conjugó con el Ab8 anti-HER2 (clon e2- 4001) de Labvision en forma de un ensayo VeraTag clivable, como el que se describe en la Solicitud de Patente USA n.º 61/015 608 (Publicación Internacional n.º W02009086197). En este ejemplo, el Ab8 anti-HER2 etiquetado con biotina a 2 µg/mL se utilizó con D9.1 anti-p95 a 2 ug/mL. Los resultados de esta forma de ensayo se presentan en las Figuras 12c y 12d. La separación de p95-positivos y p-95 negativos se mantiene en esta forma de ensayo.

**EJEMPLO 11: Inhibición del crecimiento de la línea celular del cáncer de mama utilizando anticuerpos anti-p95**

Los anticuerpos de la serie D de inmunizaciones se testaron para establecer su capacidad para inhibir el crecimiento de las líneas celulares que expresan altos niveles de HER2 SKBR3 y BT474. Las células SKBR3 y BT474 se colocaron en placas de 96 pocillos de media superficie a una densidad de 120k/pocillo y 240k/pocillo, respectivamente. Las células SKBR3 se cultivaron en 100 µL McCoy's 5A (ATCC) 10% FBS, 1% penicilina-estreptomicina y 2 mM L-glutamina. Las células BT474 se mantuvieron en 100 µL a 37 °C en 5% CO2 en 50:50 DMEM: F12, 10% FBS, 1% penicilina-estreptomicina y 2 mM L- glutamina. Tras dejar que las células se unieran durante cuatro horas, se añadieron los anticuerpos purificados que se recogen en la Figura 13 hasta unas concentraciones finales de 1.0, 3 y 10 µg/mL. Se incluyó 4D5 como control positivo. Se dejaron las células crecer durante tres días antes de valorar su crecimiento con el ensayo XTT (Sigma) conforme a las instrucciones del fabricante. La diferencia de absorbancia a 492 nm y 690 nm se consideró proporcional al número de células de cada pocillo. Estos resultados (Figura 13) sugieren que D3.4 y en cierto grado D4.1 inhiben el crecimiento de las células SKBR3 pero no de las células BT474. La diferencia de reactividad con respecto a dos líneas celulares con unos niveles de expresión de HER2 prácticamente igual de elevados se puede explicar por el hecho de que se sabe que SKBR3 desprende mayores niveles de dominio extracelular de HER2 en los medios y, por tanto, puede ser más dependiente del p95 conservado en la célula.

**EJEMPLO 12: Unos niveles muy elevados de Her2 están correlacionados con una mala respuesta al trastuzumab**

El ensayo HERmark se utilizó para medir la proteína de Her2 total (H2T) por superficie unitaria de tejido tumoral invasivo (tal y como se describe en la Solicitud de Patente USA n.º W02009086197) en muestras de tumor de mama primario fijadas con formalina e introducidas en parafina (FFPE) de 99 mujeres tratadas con trastuzumab para cáncer de mama metastásico (MBC). La tabla 4 muestra las características de la población de pacientes de los que se obtuvieron los tumores. Las muestras también se testaron mediante FISH central.

**Tabla 4**

Características del paciente			
Característica	Valor (rango, %)	Característica	Valor (rango, %)
Total de pacientes	99	Tratamiento	
Seguimiento medio	32,0(11,8-72,3)	Trastuzumab +	87 (87,9%)

(meses)		quimioterapia	
Edad media	55,2 (27,6-85,4)	Solo trastuzumab	12 (12,1%)
		Línea de quimioterapia	
Estado hormonal		Primera línea	72 (72,7%)
ER+PR+	15 (15,2%)	Segunda línea	17 (17,2%)
ER+PR-	19 (19,2%)	Tercera línea	8 (8,1%)
ER-PR+	3 (3%)	Desconocida	2 (2,0%)
ER-PR-	60 (60,06%)	Número de sitios metastásicos	
Desconocida	2 (2,0%)	<3	57 (57,6%)
		≥3	42 (42,4%)

5 Se generó un gráfico patrón del efecto del tratamiento en la subpoblación (STEPP) para examinar la tasa de supervivencia libre de progresión (PFS) 12 meses después del tratamiento con trastuzumab en toda la distribución de H2T. Grupos de 30 pacientes se ordenaron de menor a mayor por H2T. Los resultados se muestran en la Figura 14. Se observó una tendencia de probabilidad creciente de mantenerse libre de progresión tras 12 meses a mayor H2T. Sin embargo, en los niveles de H2T más elevados se observó una pronunciada caída en la tasa de PFS, consistente con una reducción de la sensibilidad al trastuzumab.

10 Se realizaron análisis Kaplan-Meier (KM) para comparar la PFS de pacientes FISH(-), H2T bajo ( $\log_{10}H2T < 1,25$ ) con pacientes con FISH(+), H2T alto ( $\log_{10}H2T \geq 1,95$  y FISH(+), H2T intermedio ( $1,25 < \log_{10}H2T < 1,95$ ). Los límites se identificaron por el valor p más bajo en un análisis de screening posicional. Los análisis KM demostraron que los pacientes que eran FISH(+), H2T intermedio tenían una PFS notablemente más prolongada que los pacientes FISH(-), H2T bajo (media de PFS de 12,6 frente a 4,5 meses; ratio de riesgo (HR) = 0,34;  $p < 0,0001$ ). Los pacientes FISH(+), H2T alto presentaban una PFS no mejor que los pacientes FISH(-), H2T bajo (media de PFS de 4,6 frente a 4,5 meses; HR = 0,7;  $p = 0,68$ ). Los resultados de los análisis KM se muestran en la Figura 15. El ensayo HERmark identificó a

15 pacientes con tumores que tenían unos altos niveles de sobreexpresión de HER2 y malos resultados con trastuzumab. Ni la magnitud de la sobreexpresión de HER2 ni el resultado de este subgrupo se podía predecir mediante FISH/número de copias de CEP 17. Los pacientes MBC con niveles muy elevados de H2T pueden representar un subconjunto de pacientes con una resistencia *de novo* al trastuzumab.

20 A pesar de que los solicitantes no pretenden limitarse a ninguna teoría mecánica concreta, entre los posibles mecanismos que pueden explicar la mala respuesta al trastuzumab observada en este grupo se pueden incluir los siguientes:

-cantidad insuficiente de trastuzumab

25 -aumento de las señales por la formación de heterodímeros que no son completamente suprimidos por el trastuzumab

-generación de fragmentos C-terminales de Her2 como HER2p95. Seis de los 15 pacientes del subgrupo con unos niveles muy elevados de H2T eran HER2p95-positivos según el ensayo de p95 con VeraTag.

### 30 Depósitos biológicos

35 El 28 de enero de 2009 se procedió a depositar tres líneas celulares hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales designados en el presente como p95.D3.4, p95.D8.2 y p95.D9.1 en la American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia) en las condiciones que establece el Tratado de Budapest. Los números de acceso ATCC para las líneas celulares hibridomas depositadas son los siguientes: PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1). Tal y como exige el Tratado de Budapest, las líneas celulares se publicarán de forma irrevocable y sin restricciones o condiciones tras la obtención de una patente.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- <110> Sperinde, Jeff  
5 Winslow, John W.  
Jin, Xueguang W.
- <120> MÉTODOS Y ENSAYOS PARA LA MEDICIÓN DE p95 Y/O p95 EN UNA MUESTRA Y  
10 ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA p95
- <130> 57618-385257
- <140> US 12/629,037  
<141> 2009-12-01  
15
- <150> US 61/118,975  
<151> 2008-12-01
- <150> US 61/182,282  
20 <151> 2009-05-29
- <150> US 61/187,960  
<151> 2009-06-17
- 25 <160> 8
- <170> Versión PatentIn 3.5
- <210> 1  
30 <211>46  
<212> PRT  
<213> Artificial
- <220>  
35 <223> Artificial = construcción sintética

ES 2 637 411 T3

<400> 1

Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys  
1 5 10 15

Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys  
20 25 30

Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser  
35 40 45

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Artificial = construcción sintética

10

<400> 2

Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser  
1 5

<210>3

<211>14

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial = construcción sintética

20

<400> 3

Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser  
1 5 10

<210>4

<211> 21

25 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 637 411 T3

<223> Artificial = construcción sintética

<400> 4

**Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp**  
1 5 10 15

**Lys Gly Cys Pro Ala**  
20

5 <210>5  
<211>13  
<212> PRT  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Artificial = construcción sintética

<400> 5

**Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys**  
1 5 10

<210> 6  
15 <211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> Artificial = construcción sintética

<400> 6

**Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys**  
1 5 10 15

25 <210> 7  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> Artificial = construcción sintética

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

5

<223> ACETILACIÓN

<400> 7

Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp  
1 5 10 15

Lys Gly Cys Pro Ala Lys Lys  
20

<210> 8

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Artificial = construcción sintética

<400> 8

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala  
1 5

20

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo aislado, o fragmentos de anticuerpos, que se unen específicamente al dominio extracelular de p95 pero no a Her-2 de longitud completa, donde el anticuerpo se une específicamente al péptido que tiene la SEC. ID. N. ° 5.
2. El anticuerpo según la reivindicación 1, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo comprende uno de los anticuerpos producidos por las líneas celulares hibridomas depositadas en ATCC con el número de acceso PTA-9738 (p95.D3.4), PTA-9739 (p95.D8.2) y PTA-9740 (p95.D9.1).
- 10 4. Un método para medir y/o cuantificar la presencia y/o cantidad de P95 o p95 en un complejo en una muestra, donde el método consiste en medir o cuantificar la cantidad de p95 en una muestra utilizando el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 15 5. Un método in vitro para determinar si es probable que un sujeto que padece un cáncer responda al tratamiento con un agente que actúa sobre Her-2 utilizando el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 6. El método de las reivindicaciones 4 o 5, donde la muestra o el cáncer del sujeto es un cáncer de mama, preferiblemente el cáncer del sujeto es un cáncer de mama metastásico; un carcinoma, un sarcoma, un mieloma, una leucemia, un linfoma, o un cáncer de tipo mixto; o al menos un cáncer de huesos, un cáncer cerebral, un cáncer del sistema endocrino, un cáncer gastrointestinal, un cáncer ginecológico, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de tiroides, un cáncer del tracto urinario; o un cáncer metastásico.
- 25 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 y 6, donde la muestra comprende una muestra de tejido, una muestra fijada, una muestra congelada o un lisado; o donde la muestra es una muestra de tumor, una muestra de tejido tumoral congelada o un lisado tumoral.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 y 6 a 7, donde la muestra comprende fluido corporal; preferiblemente la muestra es sangre, plasma o linfa; preferiblemente la muestra de sangre o plasma contiene células tumorales circulantes.
- 30 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 y 6 a 8 donde la medición de la cantidad de p95 en la muestra biológica comprende el uso de inmunohistoquímica para cuantificar la cantidad de proteína p95; o la medición de la cantidad de proteína p95 total.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 y 6 a 9, donde la medición de la cantidad de p95 en la muestra biológica comprende los pasos siguientes:
- 35 (a) poner en contacto la muestra biológica con una composición de unión a p95 que se une específicamente a la proteína p95, donde la composición de unión a p95 comprende el anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- (b) poner en contacto la composición de unión a p95 con una composición de unión etiquetada, donde la composición de unión etiquetada comprende una etiqueta molecular unida a través de un ligamiento clivable, y donde la composición de unión etiquetada se une específicamente a la composición de unión a p95;
- 40 (c) clivar el ligamiento clivable de la composición de unión etiquetada, liberando así la etiqueta molecular; y
- (d) cuantificar la etiqueta molecular liberada para determinar la cantidad de proteína p95 de la muestra biológica.
- 45 11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, donde el agente que actúa sobre Her-2 está dirigido al dominio extracelular de Her-2.
- 50 12. El método de la reivindicación 11, donde el agente que actúa sobre Her-2 comprende al menos trastuzumab, pertuzumab lapatinib, canertinib, mubritinib, AEE-788, HKI-272, BIBW-2992, o BMS-599626; preferiblemente, el agente que actúa sobre Her-2 comprende trastuzumab; y/o el agente que actúa sobre Her-2 comprende trastuzumab dentro de una terapia de combinación; y la terapia de combinación comprende también al menos citarabina, melfalan, topotecán, fludarabina, etoposido, idarrubicina, daunorrubicina, mitoxantrona, cisplatino, paclitaxel, o ciclofosfamida.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, donde el agente que actúa sobre Her-2 es un inhibidor de la tirosina quinasa.
- 55 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 y 11 a 13, donde el cáncer del sujeto comprende un cáncer Her2-positivo.



Serie P95.D

Nombre	Her2-D pep	Her2-hFc	Her2-A pep
D1	0.837	0.563	1.553
D3	2.306	0.089	0.134
D4	3.941	1.683	0.107
D5	3.417	0.094	0.108
D6	0.902	1.720	0.086
D7	2.087	0.115	0.093
D8	3.701	0.219	0.084
D9	3.460	0.311	0.084
D10	3.120	0.087	0.094
D11	3.392	0.103	0.081
D12	3.871	4.000	0.092
D13	1.189	0.092	0.096
Her2 Ab5		3.929	
A3			3.130

FIG. 1

# Inmunoblots - Serie P95.D

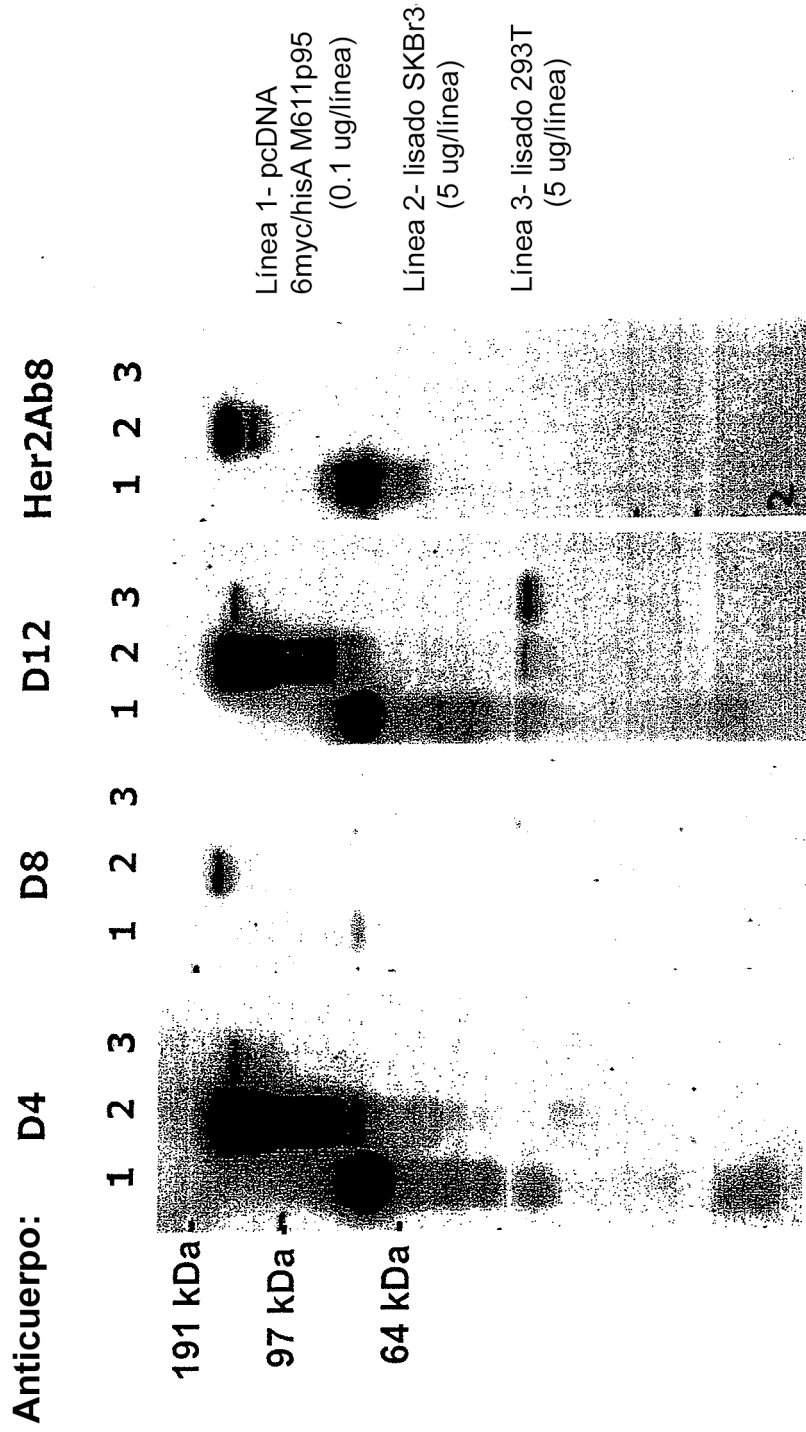


FIG. 2

# Serie p95.D – tinción FACS nativa

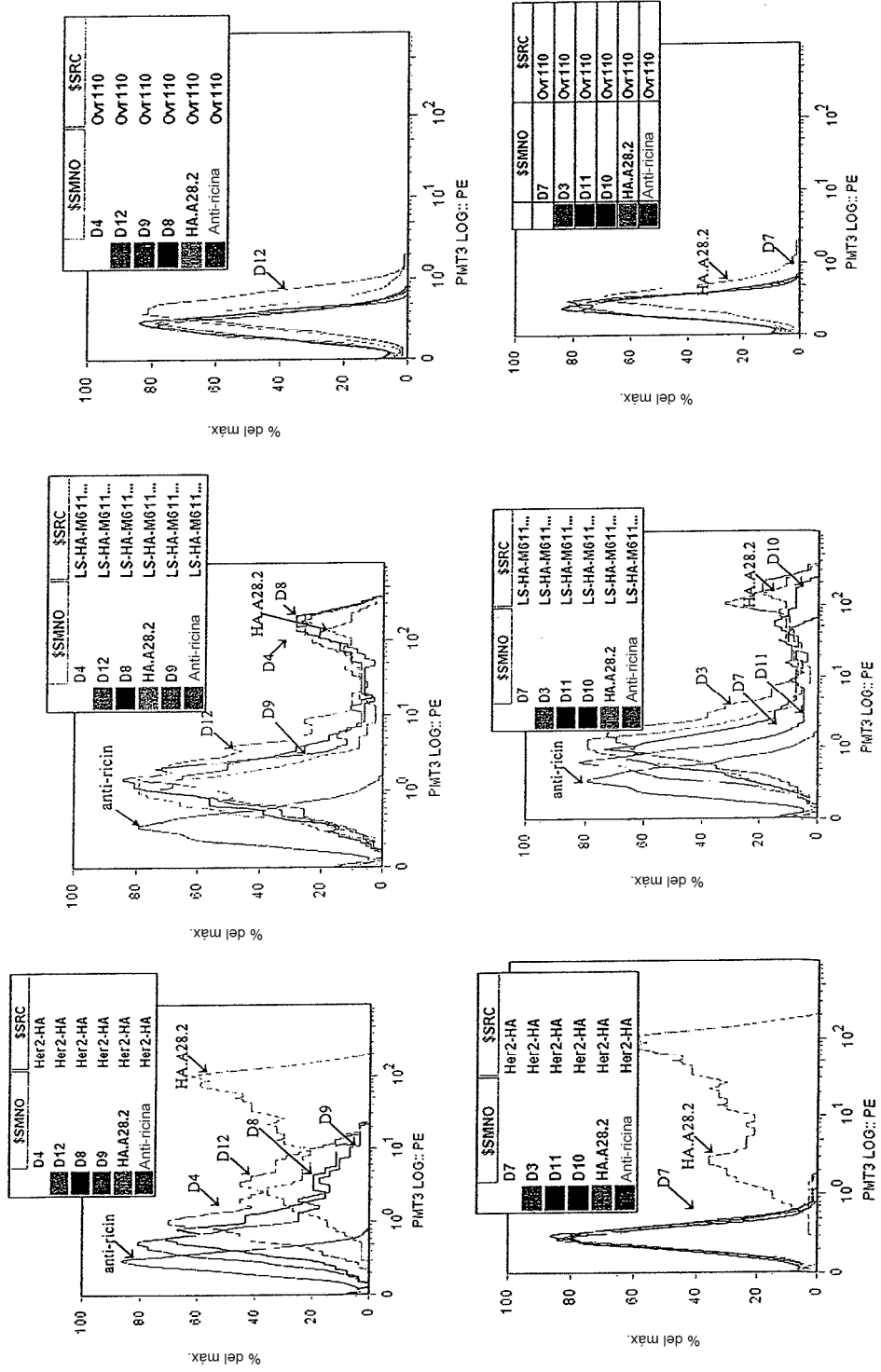


FIG. 3a

p95.D fijado/por tinción FACS

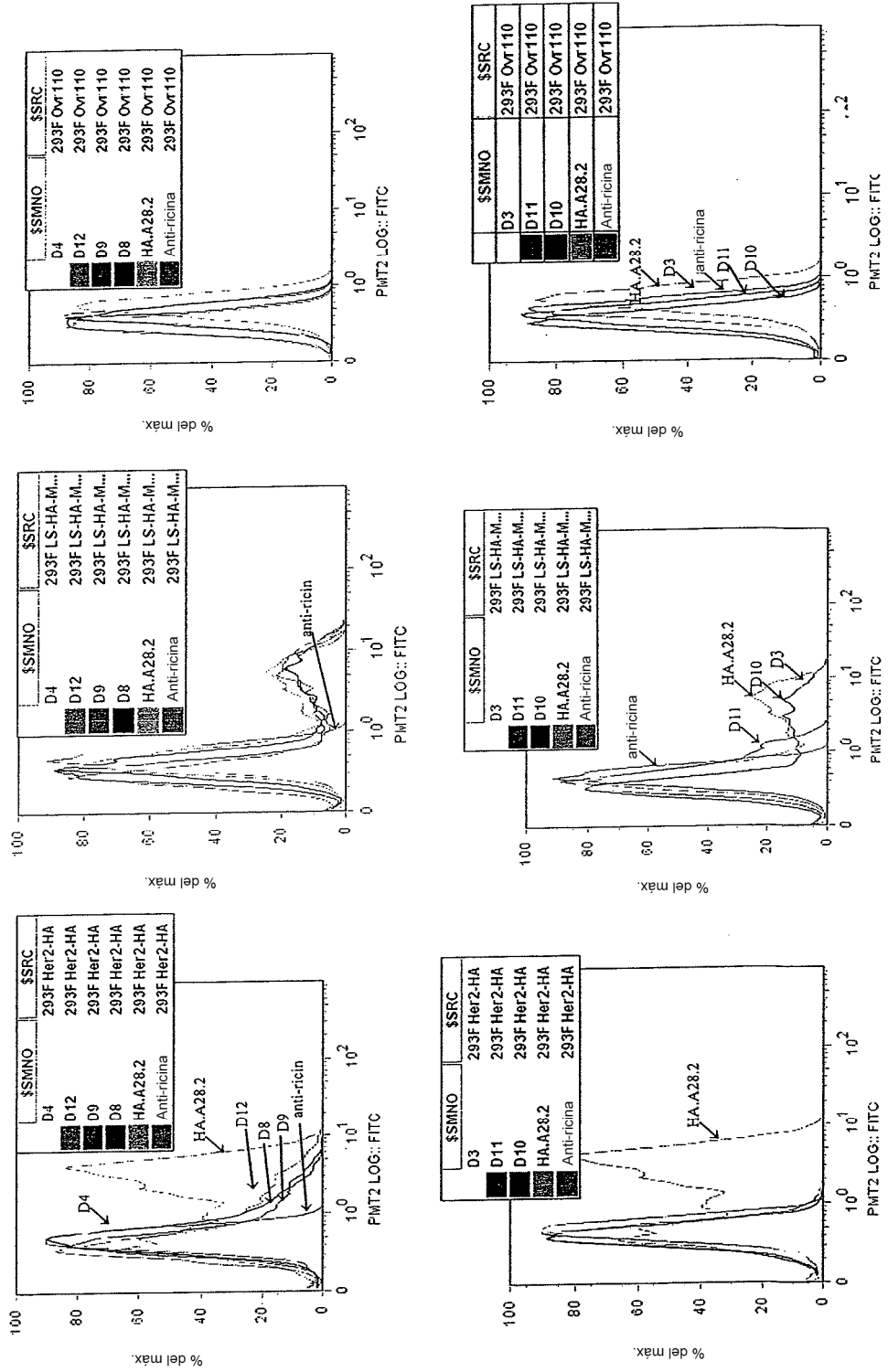


FIG. 3b

# Expresión de p95 y HER2

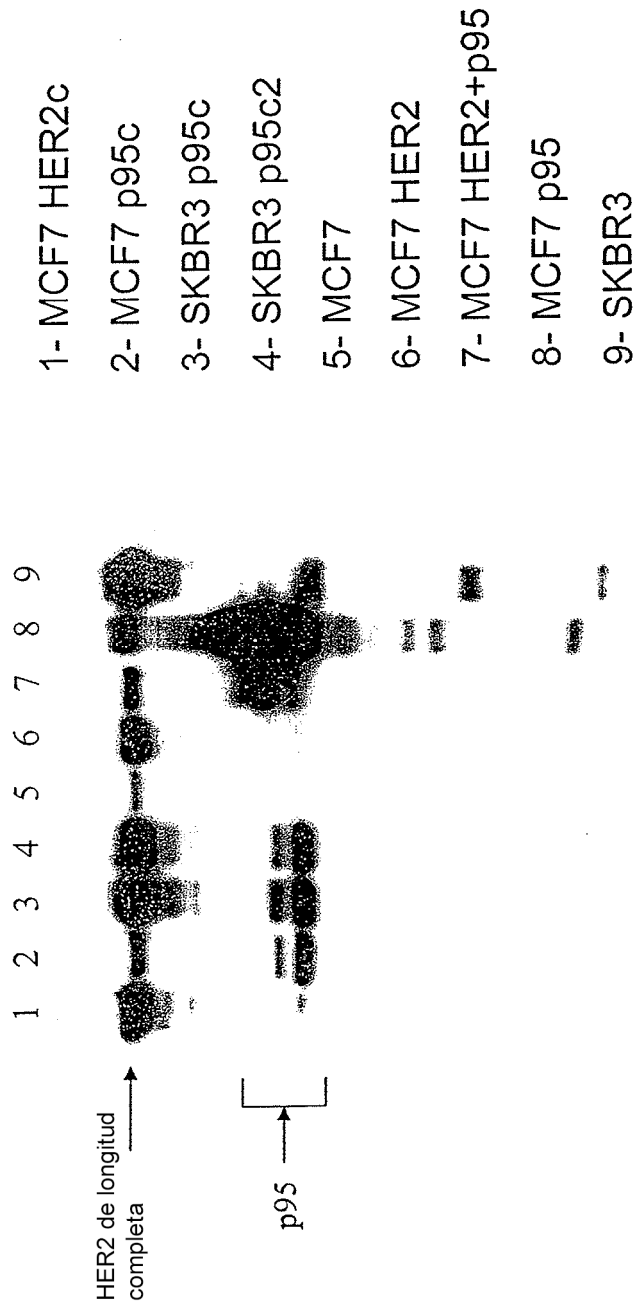


FIG. 4



# Reproducibilidad

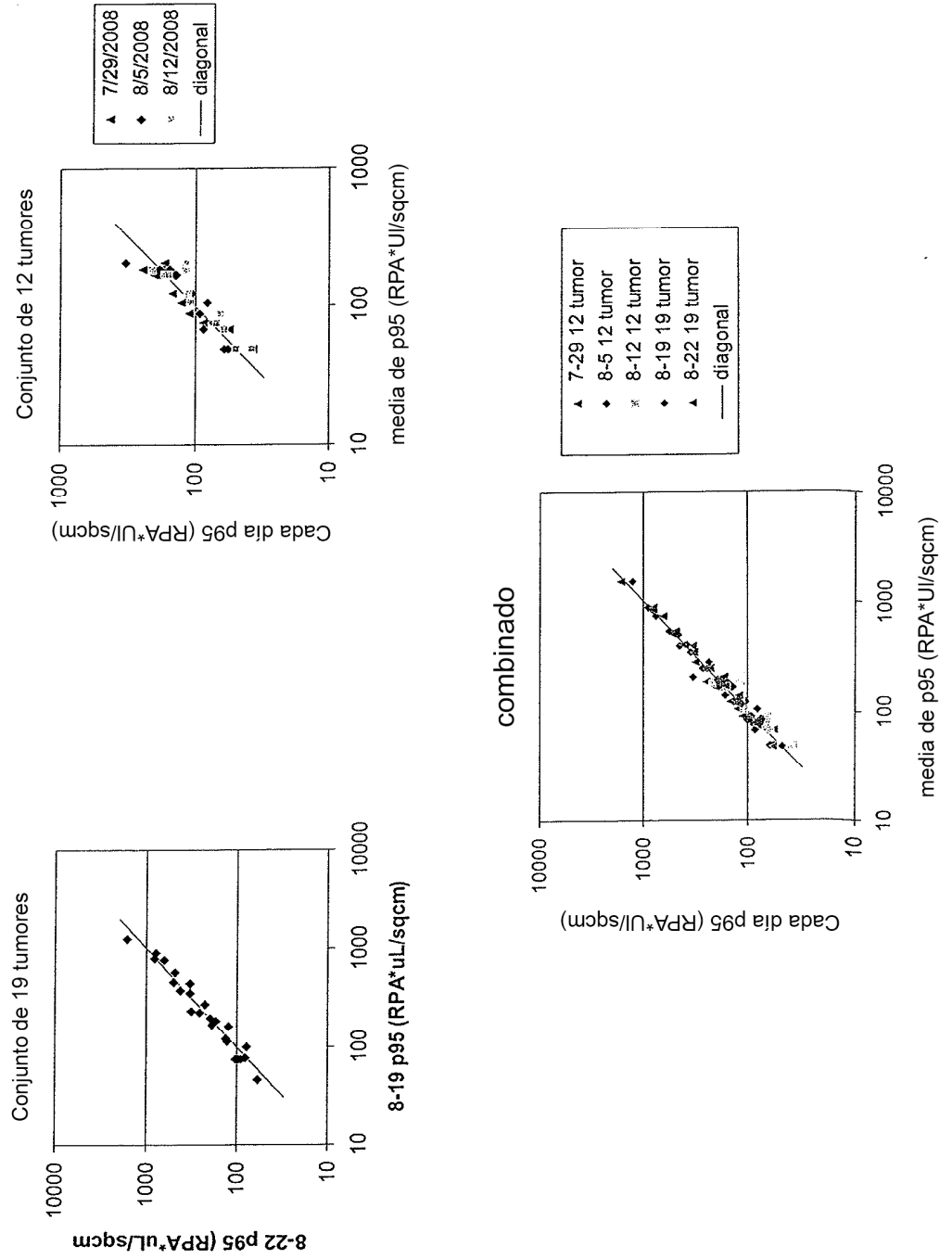
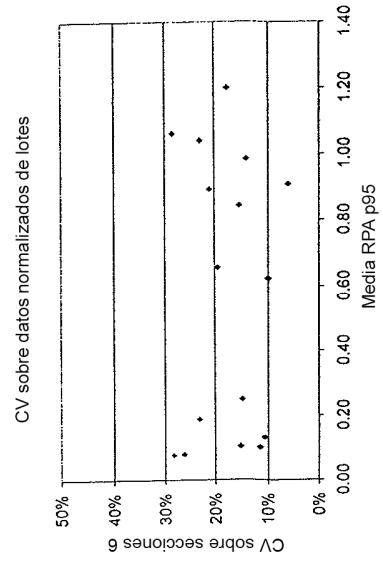
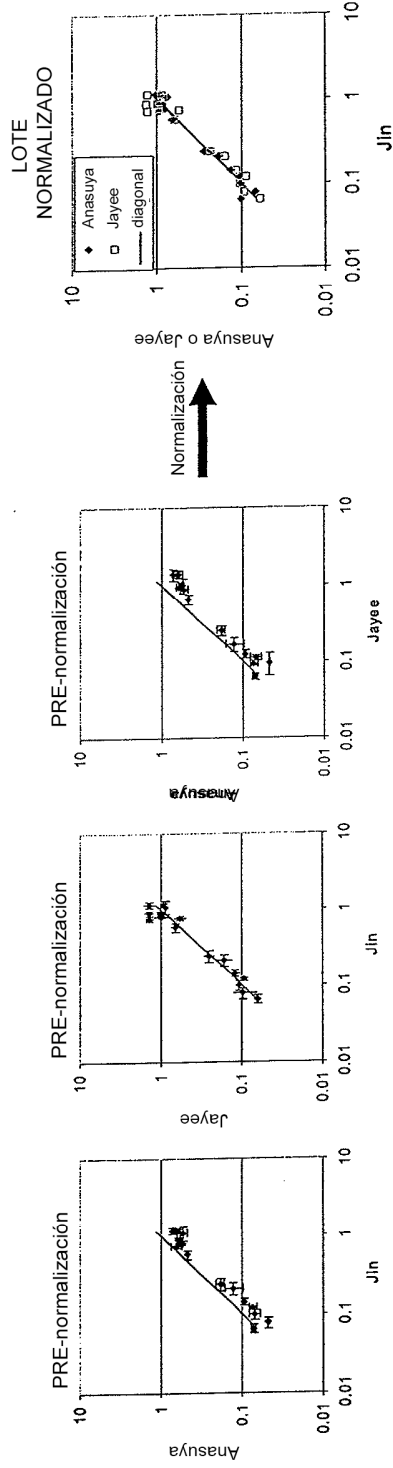


FIG. 5b

## Uso de parámetros para conseguir uniformidad en el tiempo

- Uniformidad lote a lote conseguida utilizando parámetros de normalización
- Aquí se testó un rango de transfectantes de p95 y ADAM10 que representan un rango de p95

### Tres comparaciones bidireccionales entre operadores



CV < 30% para un rango de lotes/operadores en todo el rango dinámico

FIG. 5C



Screening de anticuerpos purificados

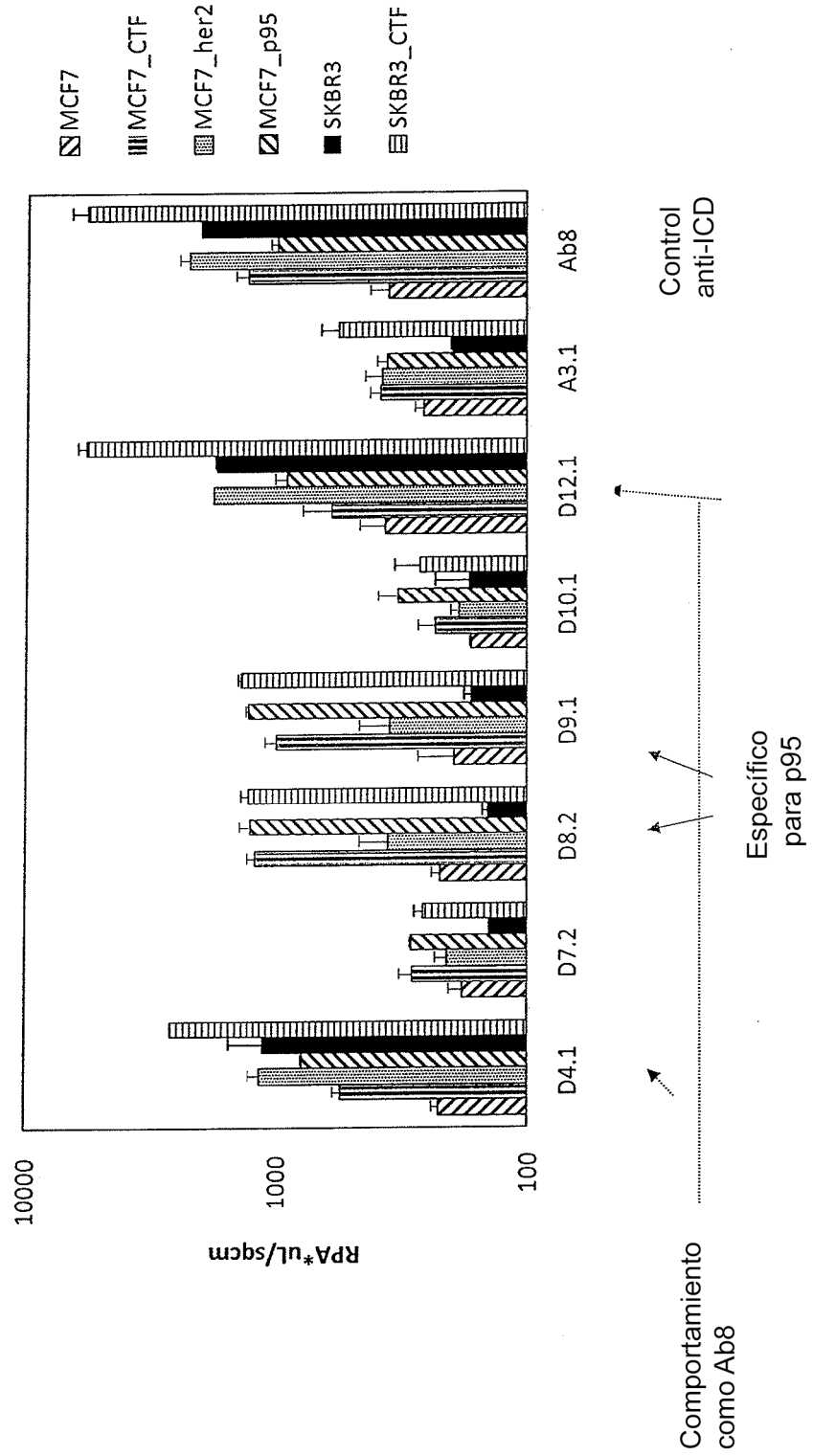


FIG. 6

Medición en tumores

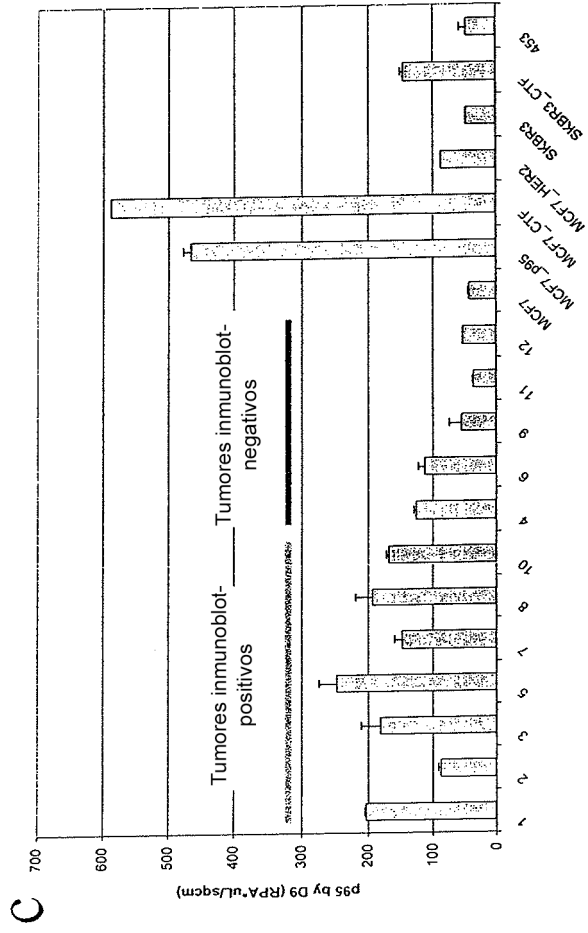
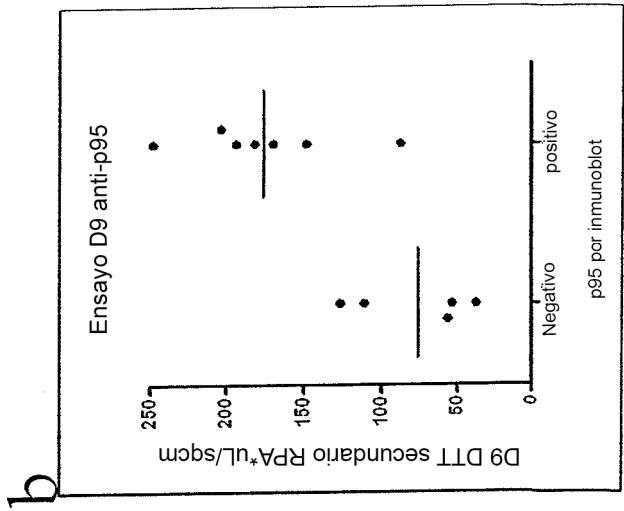
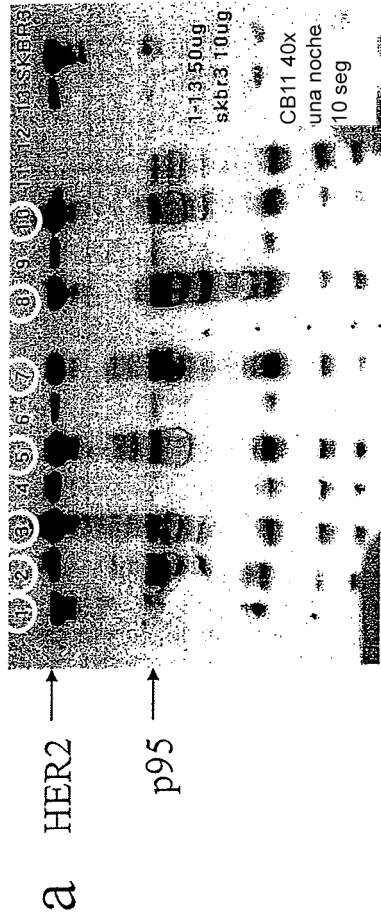


FIG. 7A-C

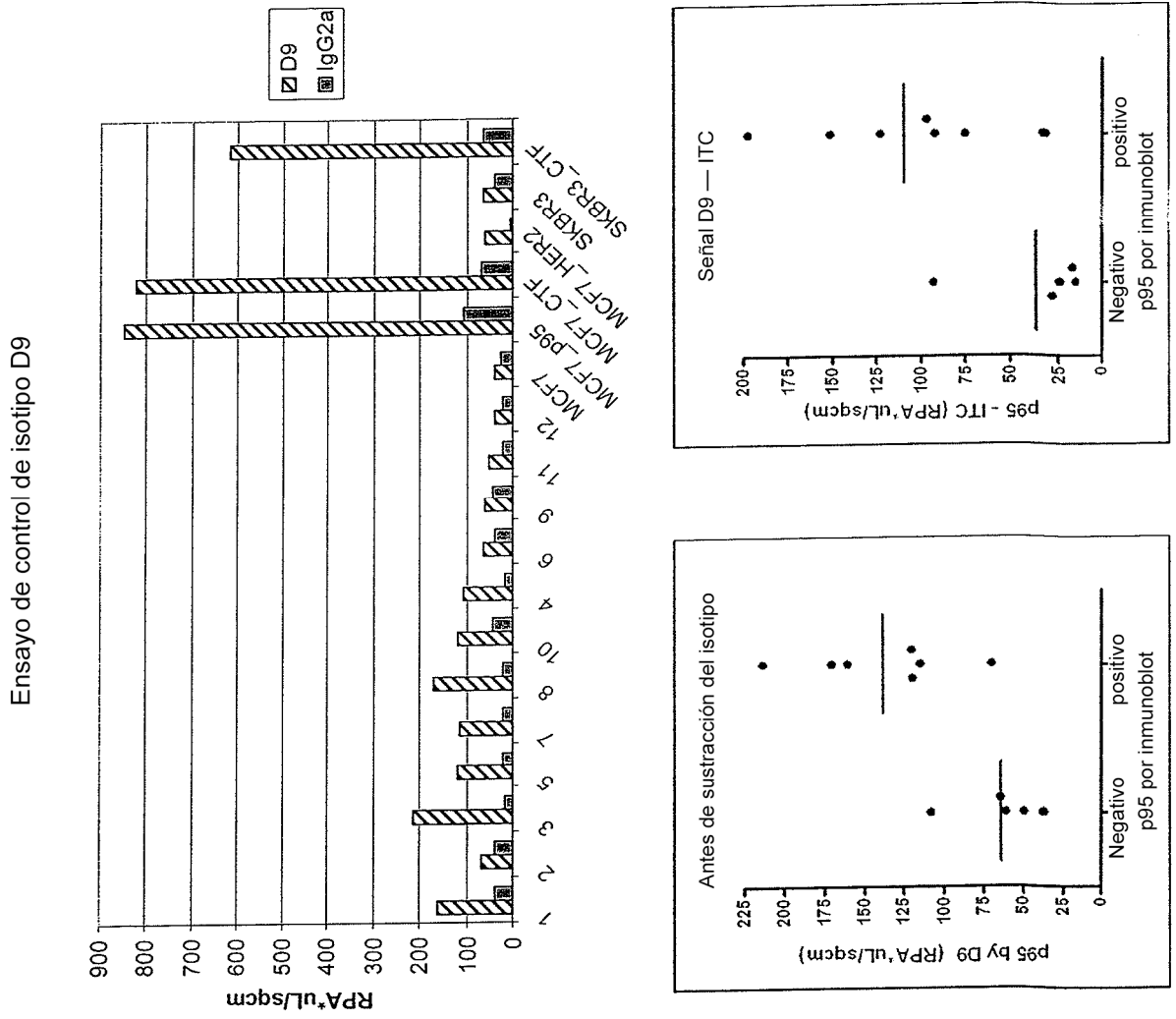


FIG. 8A-C

# ¿H2T ultra alto Enriquecido en p95+?

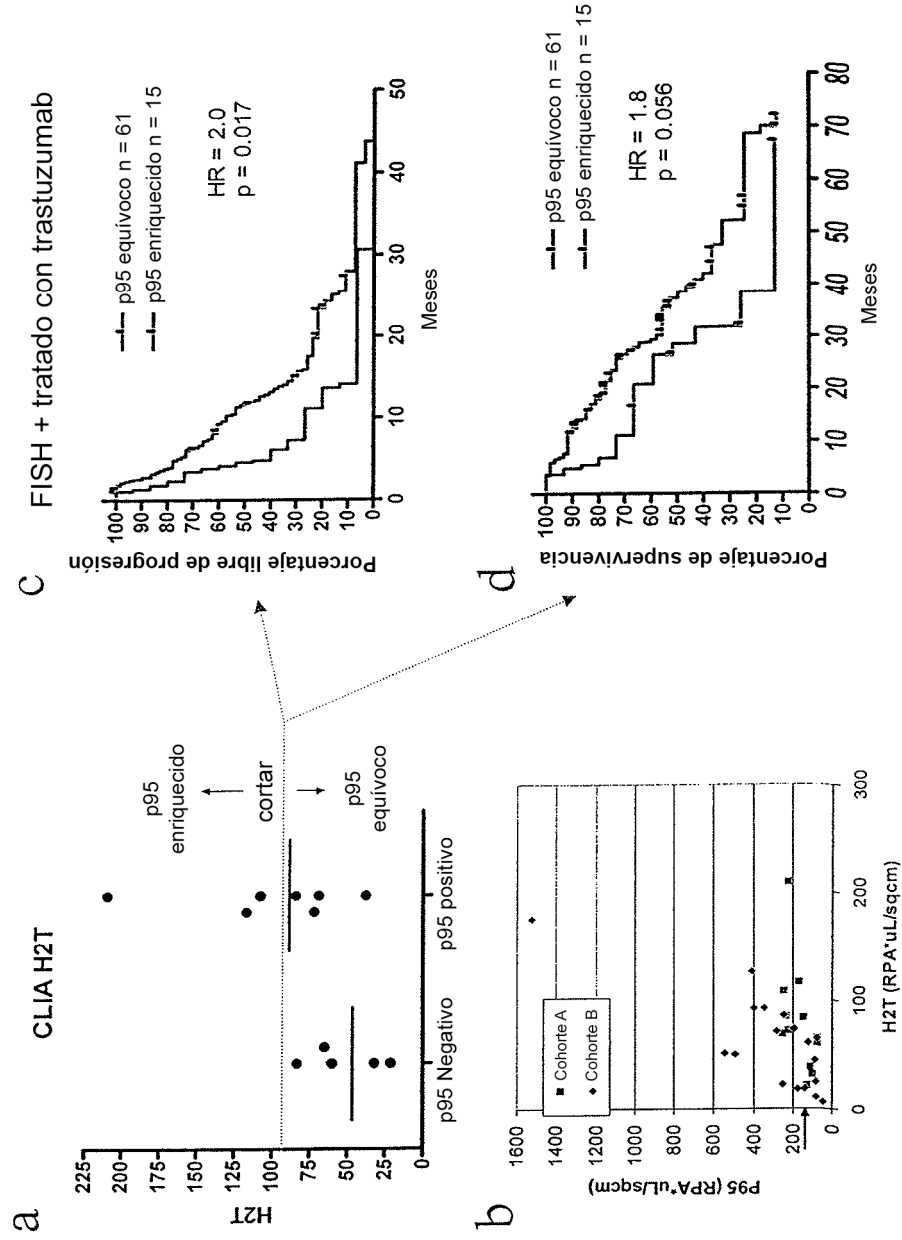


FIG. 9

IHC con clon D9.1 anti-p95 en líneas celulares

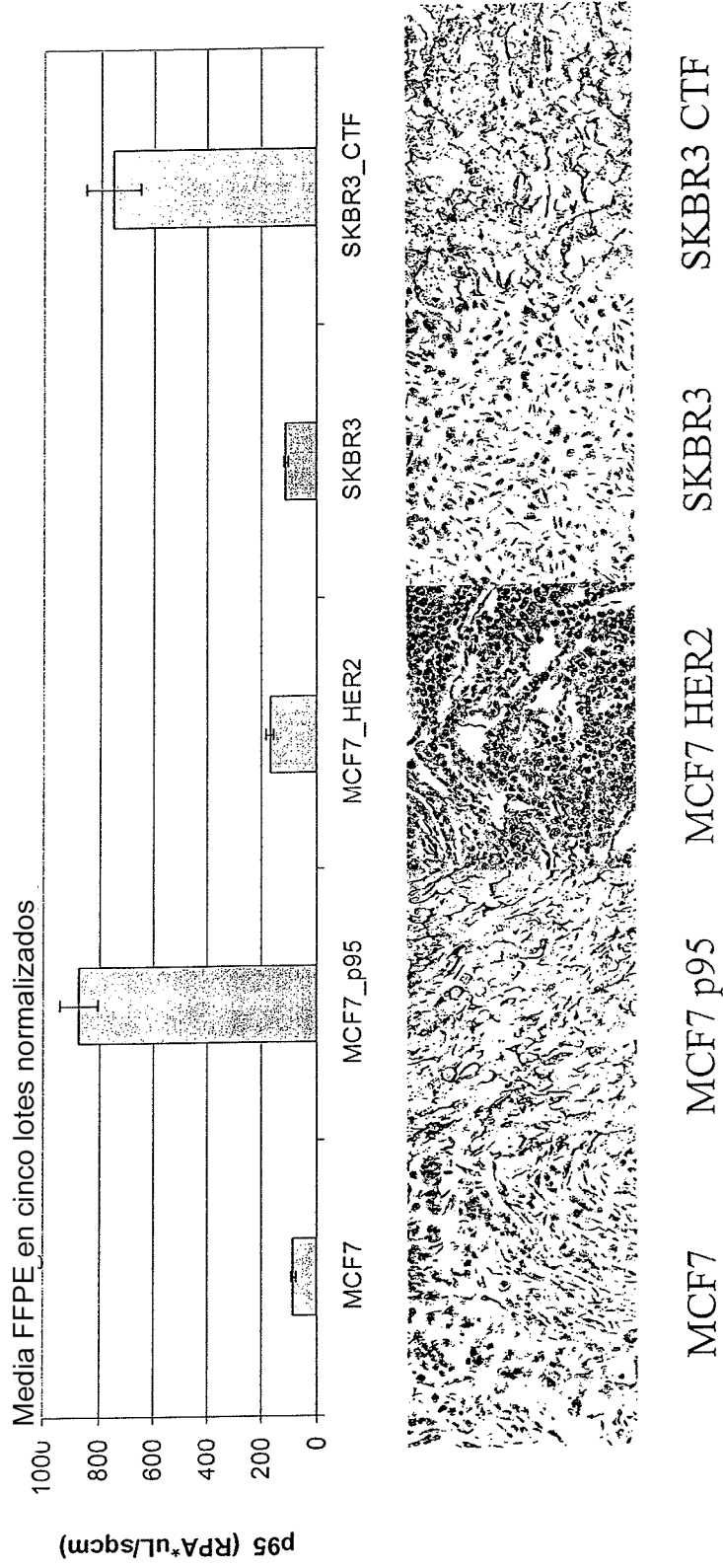
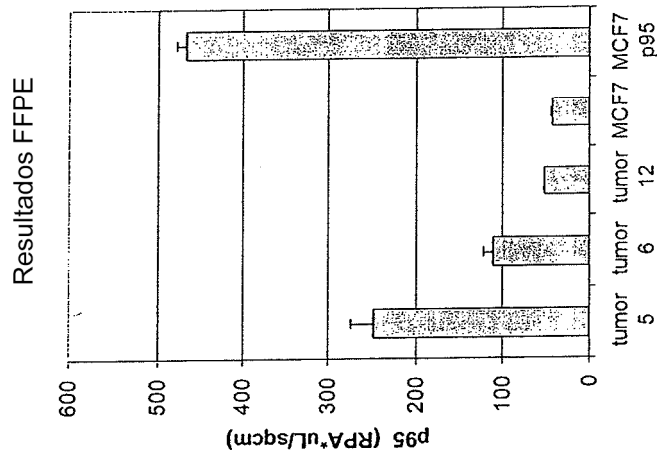


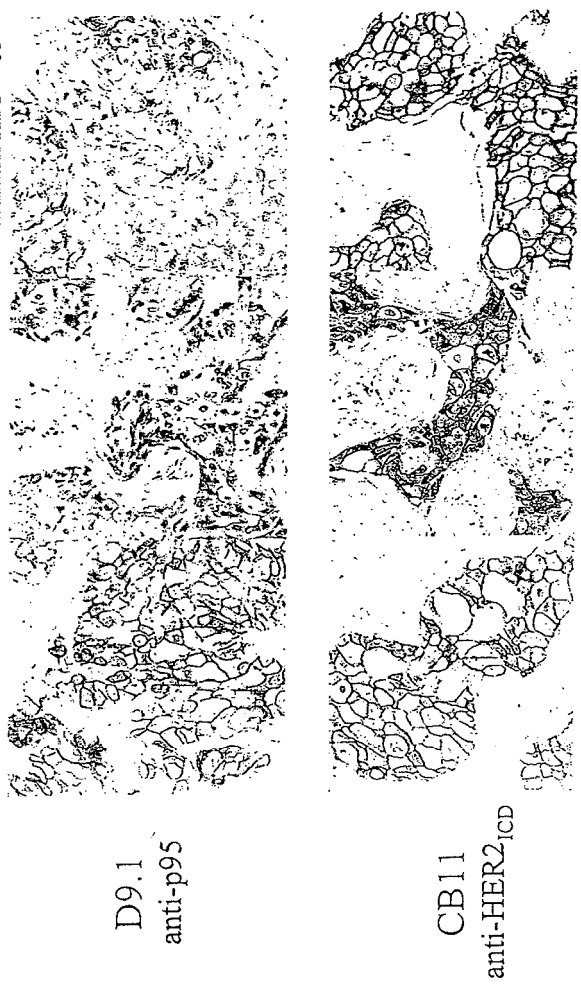
FIG. 10A

# IHC con clon D9.1 anti-p95 en tumores

Señal p95 FFPE más fuerte (n.º 5) comparada con dos HER2-positivos pero p95 bajo o negativo



#5 (p95+)      #6 (p95-)      #12 (p95-)  
 HERmark H2T = 108    HERmark H2T = 21    HERmark H2T = 65



Imágenes del conjunto de 12 tumores

FIG. 10B

# Screening de anticuerpos etiquetados con vTag

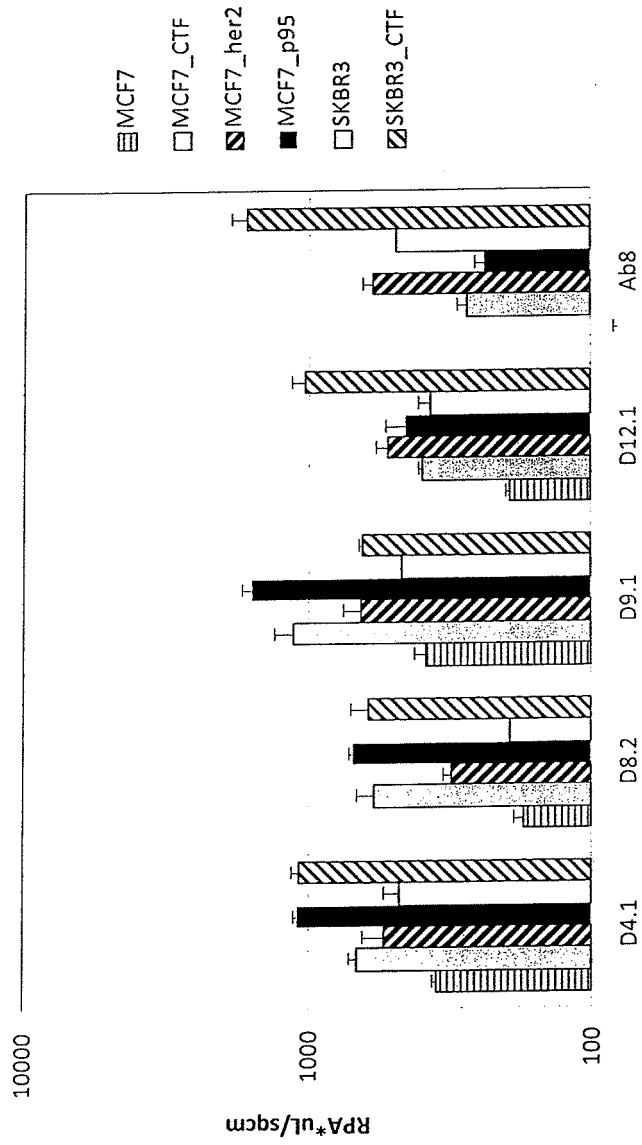


FIG. 11

Medición en tumores

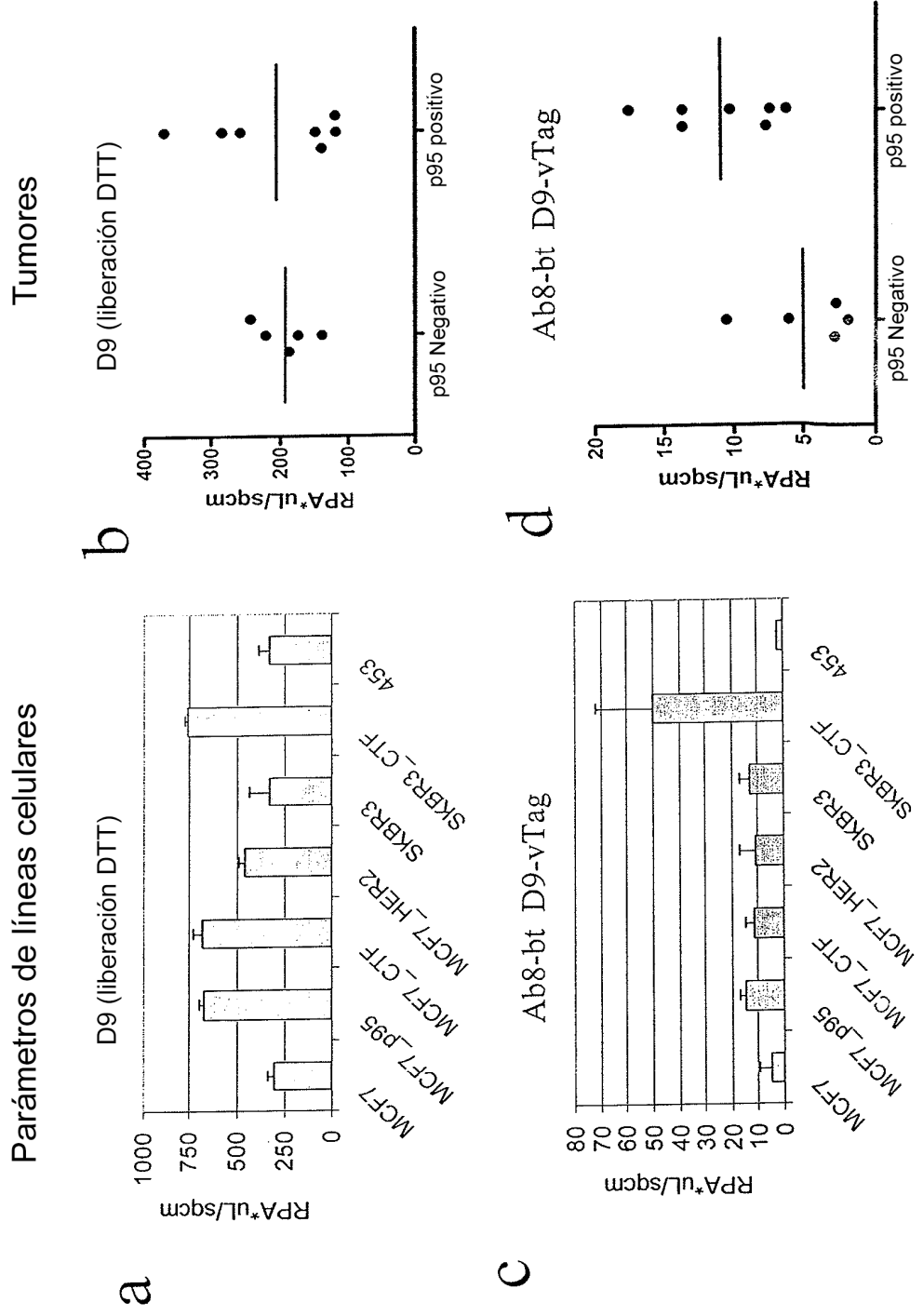


FIG. 12



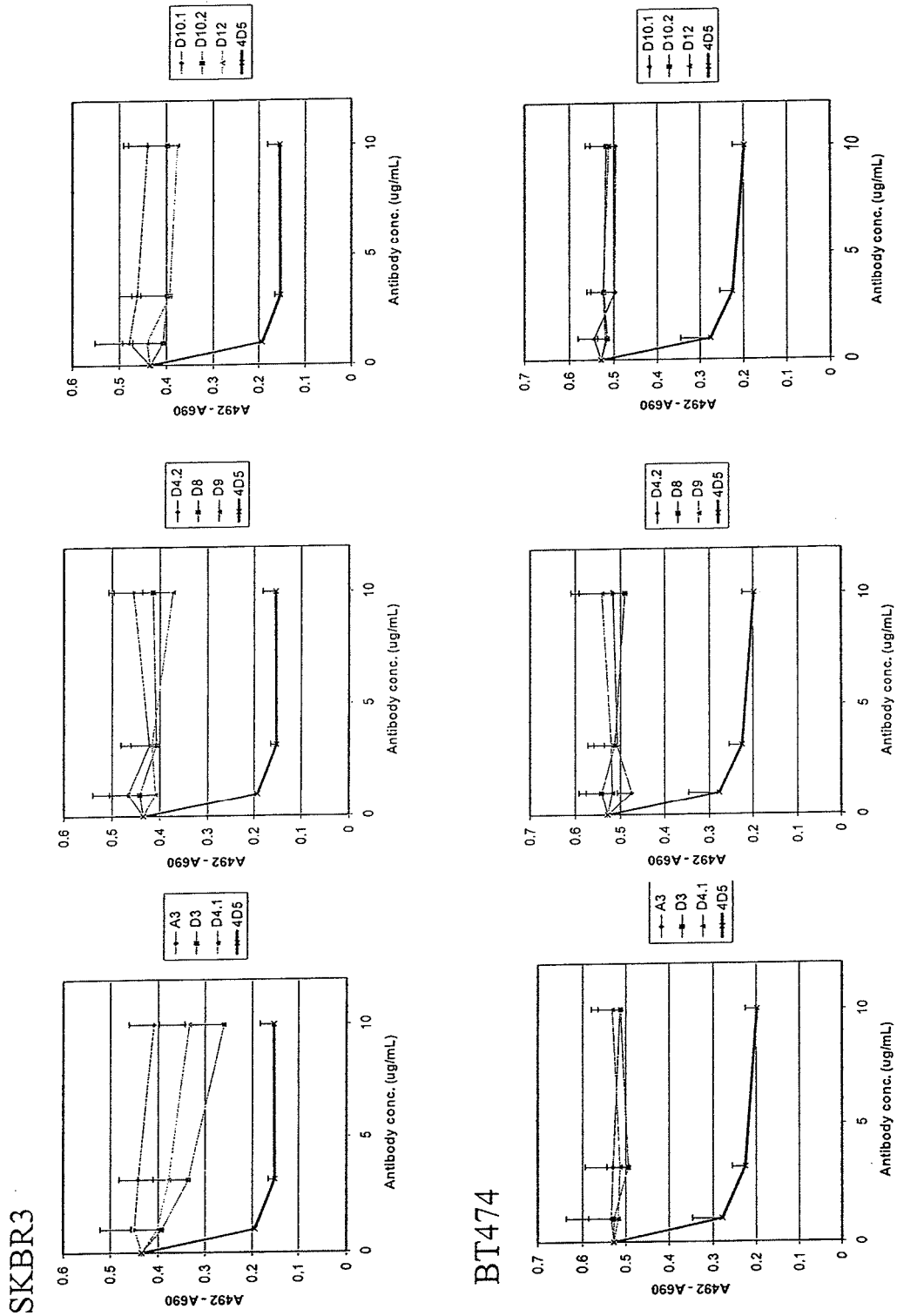


FIG. 13

### Resultado como función de HER2

- HER2 (H2T) se midió con VeraTag
- La probabilidad de progresión a los 12 meses se calculó para grupos de 30 pacientes ordenados de menor a mayor en términos de H2T
- Se observó una tendencia de probabilidad creciente de permanecer libre de progresión tras 12 meses a mayor H2T
- Se observó una discontinuidad de esta tendencia para los grupos con unos niveles medios de H2T aproximados de 70.

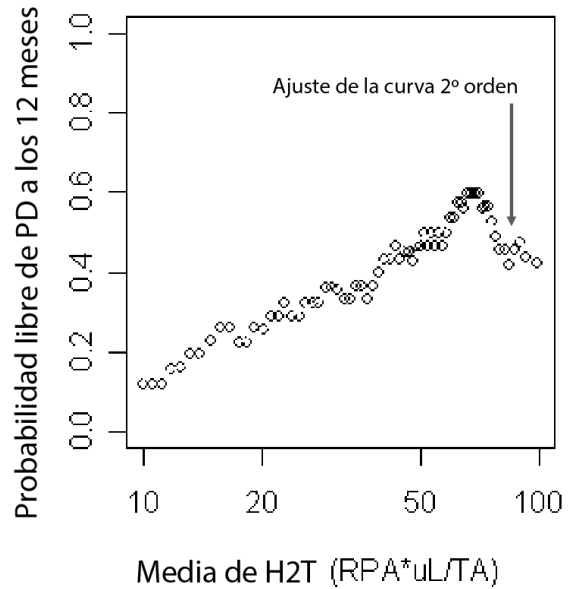
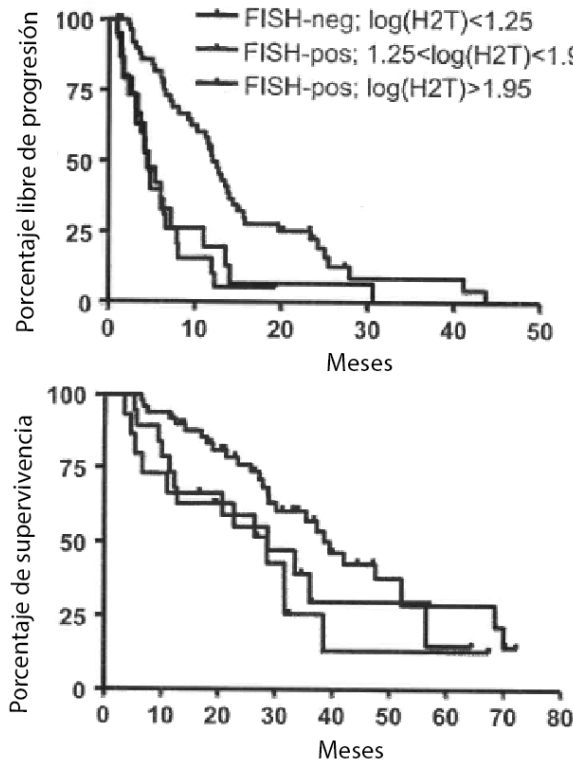


FIG. 14

Pacientes con resultados HER2 muy elevados similares al FISH

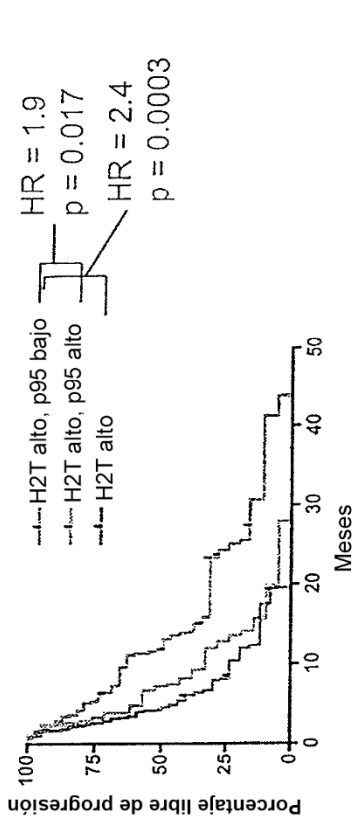


Estado FISH	Estado HER2 total	n	Media TTP (meses)	TTP HR (valor p) frente a FISH(-)	Media OS (meses)	OS HR (valor p) frente a FISH(-)
FISH-	log(H2T)<1.25	19	4.5	1 (1)	28.7	1 (1)
FISH+	1.25<log(H2T)<1.95	51	12.6	0.34 (p<0.0001)	39.6	0.56 (0.005)
FISH+	log(H2T)>1.95	15	4.6	0.87 (0.68)	28.6	0.79 (0.58)

- El ensayo VeraTag de H2T identificó a pacientes con tumores que tenían unos altos niveles de sobreexpresión de HER2 y malos resultados con trastuzumab.
- Los resultados fueron similares cuando se excluyeron los nueve pacientes que recibían solo trastuzumab (frente a FISH-neg, TTP HR=0,36 (p=0,0004) y 0,92 (p=0,8) para niveles de H2T intermedios y máximos, respectivamente).
- Los resultados fueron similares cuando se excluyeron los cuatro pacientes IHC 2\* (frente a FISH-neg, TTP HR=0,35 (p=0,0001) y 0,79 (p=0,5) para niveles de H2T intermedios y máximos, respectivamente).
- La inclusión de p95-negativos solamente en el análisis de OS aumenta la distinción entre el grupo de H2T intermedio y el de FISH-negativo: HR=0,37 (p=0,013)

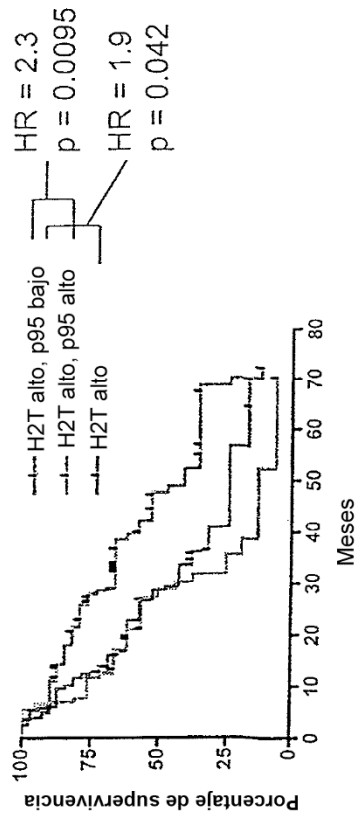
FIG. 15

**TTP**



Subgrupo (n)	TTP media
H2T alto, p95 bajo (n=40)	11.7 meses
H2T alto, p95 alto (n=21)	7.2 meses
H2T alto (n =29)	4.4 meses

**OS**



Subgrupo (n)	Supervivencia media
H2T alto, p95 bajo (n=40)	48 meses
H2T alto, p95 alto (n=21)	29 meses
H2T alto (n =29)	29 meses

FIG. 16

TTP

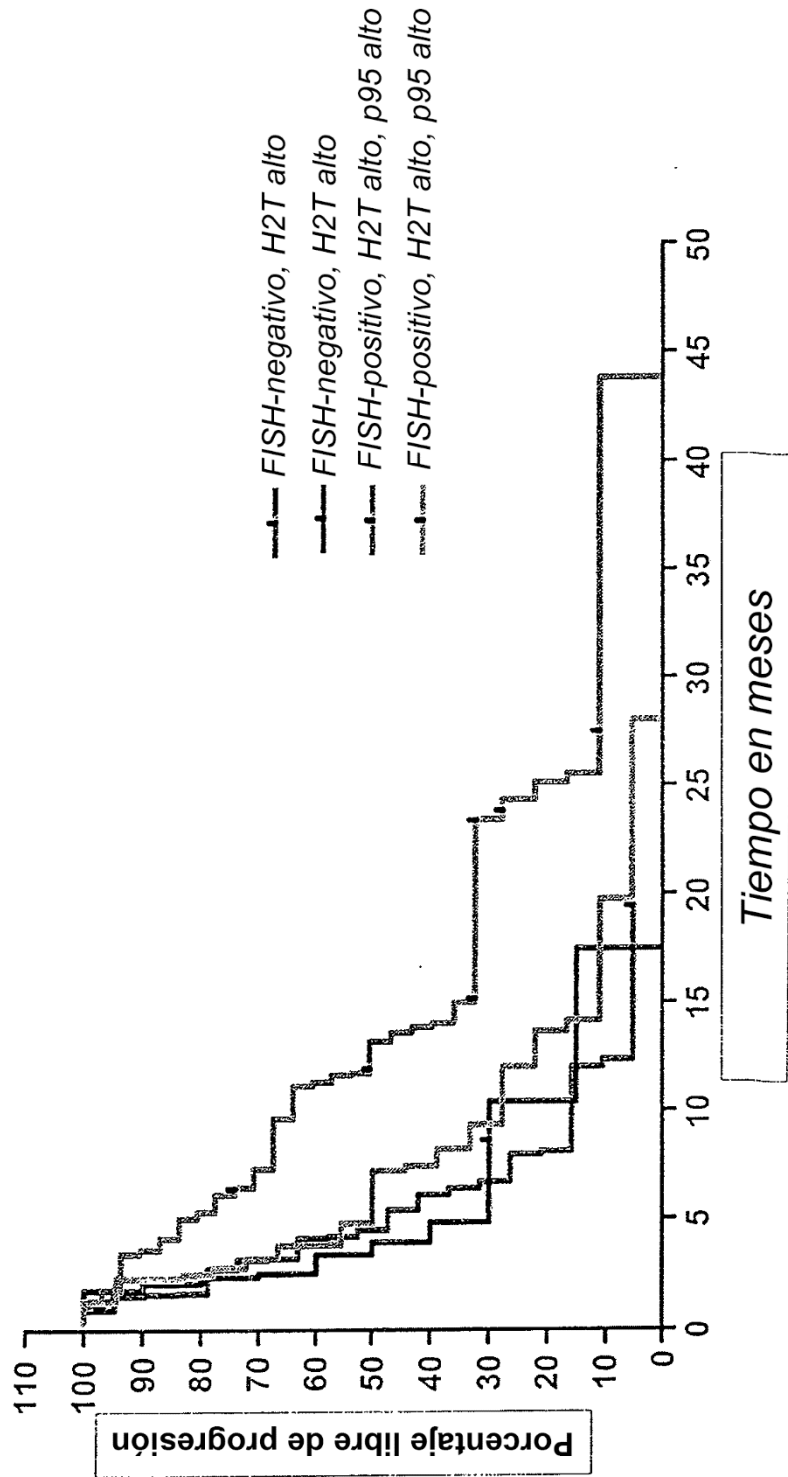


FIG. 17