(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 641 479**

(51) Int. CI.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G06F 19/00 (2011.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.06.2010 PCT/US2010/039648**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.01.2011 WO11005570**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2010 E 10797600 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2473854**

(54) Título: **Sistemas y métodos para tratar, diagnosticar y predecir la respuesta a la terapia del cáncer de mama**

(30) Prioridad:

23.06.2009 US 269395 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2017

(73) Titular/es:

FUNDAÇÃO D. ANNA DE SOMMER CHAMPALIMAUD E DR. CARLOS MONTEZ CHAMPALIMAUD (100.0%)
Avenida Brasilia
1400-038 Lisboa , PT

(72) Inventor/es:

DONOVAN, MICHAEL;
KHAN, FAISAL y
POWELL, DOUG

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

Sistemas y métodos para tratar, diagnosticar y predecir la respuesta a la terapia del cáncer de mama

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere generalmente a métodos y sistemas para el diagnóstico, el pronóstico y la monitorización del cáncer de mama.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

HER2 es un miembro de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico y se amplifica/sobreexpresa en aproximadamente el 15-20 % de cánceres de mama. HER-2 es un miembro no ligando de la familia ERbB y se activa principalmente por sobreexpresión que conduce a homodimerización espontánea, fosforilación de la parte c-terminal de Her2 y activación de eventos de señalización aguas abajo de una manera independiente del ligando. Además, Her2 también experimenta una escisión proteolítica que da como resultado la liberación del dominio extracelular y la producción de un fragmento de membrana truncado, p95, que es constitutivamente activo. Se ha planteado la hipótesis de que la forma fosforilada de HER2 (pHER2) refleja con mayor precisión la señalización y la actividad funcional de la proteína HER2 y evidencias recientes han demostrado una asociación entre pHER2 y el número de copias del gen HER2 evaluado por hibridación fluorescente in situ (FISH).

La sobreexpresión de HER2 es un factor pronóstico adverso independiente y actualmente el mejor factor predictivo para la actividad de trastuzumab, una terapia de anticuerpos monoclonales anti-HER2. Actualmente, el estado de HER2 se determina con mayor frecuencia mediante la detección inmunohistoquímica de la expresión de la proteína HER2 en la superficie de la membrana celular o por FISH del número de copias del gen HER2 en tejido fijo usando sondas específicas del locus para el gen HER2 y el cromosoma 17. Estos métodos continúan siendo problemáticos debido a problemas de reproducibilidad intra e inter laboratorios y una variable preanalítica, tal como el tiempo de fijación. FISH es considerada como el estándar de referencia y predice con mayor precisión la respuesta a la terapia, pero es técnicamente exigente, costosa y requiere equipo especializado.

Trastuzumab, usado en solitario o en combinación con quimioterapia, ha mostrado un beneficio clínico significativo en la mejora de la supervivencia en pacientes metastásicos, así como la reducción a la mitad de la tasa de recidiva y una mejora de la supervivencia en cáncer de mama temprano. Aunque la sobreexpresión es un predictor útil para la respuesta, sólo aproximadamente un tercio de los pacientes, sin embargo, inicialmente responden a la monoterapia con trastuzumab y la mayoría de los pacientes que responden iniciales demuestran avance de la enfermedad en un año del inicio del tratamiento. Saez et al., 2006 y otros han propuesto que una forma truncada terminalmente del receptor, p95HER2, que permanece unido a la membrana y fosforilado con tirosina, proporciona un mecanismo para la resistencia al anticuerpo monoclonal trastuzumab.

Recientemente, Frogne et al., 2009 demostraron que, en un ajuste multivariado, los niveles de la forma fosforilada de Her2 (pHer2) en receptores hormonales positivos, los tumores primarios eran un predictor independiente para la mala supervivencia libre de enfermedad y global cuando se ensayaron contra tamaño tumoral, grado, estado nodal y Her2. Los resultados sugieren que en la enfermedad resistente a trastuzumab se deben considerar nuevas estrategias y compuestos, incluyendo opciones terapéuticas alternativas tales como inhibidores de cinasa duales de molécula pequeña (por ejemplo, lapatinib), y dianas selectivas dentro de la ruta angiogénica (por ejemplo, bevacizumab).

Estudios anteriores demostraron que la expresión de la proteína p95HER2 truncada se correlacionaba con la extensión de la afectación de los ganglios linfáticos y la enfermedad metastásica, lo que sugiere que representa un marcador para una enfermedad más agresiva. Dado que el trastuzumab bloquea la actividad de HER2 uniéndose a una parte del receptor que está situada en el exterior de la célula; la hipótesis es que el p95HER2 truncado (y/o el receptor de longitud completa pHer2) permanece activo y puede responder a inhibidores de la actividad tirosina cinasa, tal como lapatinib. Scaltriti et al. 2007 demostraron que el tratamiento de las células que expresan p95HER2 con lapatinib inhibió la fosforilación de p95HER2, redujo el pAKT aguas abajo e inhibió el crecimiento celular.

Frogne Thomas et al., Breast Cancer Research, Current Science, London, GB, 24 February 2009, vol. 11, n.º 1, página R11, XP021053447, ISSN: 1465-5411, DOI: 10.1186/BCR2230 describen: la determinación de la fosforilación de HER2 en la tirosina 1221/1222 mejora la predicción de mala supervivencia para pacientes de cáncer de mama con tumores positivos para receptores hormonales.

G Pietro et al., Modern Pathology, 30 January 2004, vol. 17, n.º 3, páginas 227-287, XP055047909, ISSN: 0893-3952, DOI: 10.1038/modpathol.3800006 describen: el análisis de la amplificación de HER-2/neu en carcinoma endometrial mediante hibridación cromogénica in situ.
Fink-Retter Anneliese et al., Oncology Reports, August 2007, vol. 18, n.º 2, XP002689304, ISSN: 1021-335X describen: la expresión espacial diferencial y el patrón de activación de EGFR y HER2 en cáncer de mama humano.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En el documento U.S. - se diagnosticaron 211.000 mujeres con cáncer de mama cada año, de las cuales 42.000 sobreexpresaban HER2. Solamente menos del 35 % de estas pacientes que sobreexpresan HER2 responden a la terapia con trastuzumab (Herceptin) y de las pacientes que responden iniciales, el 25 % de las pacientes con cáncer de mama metastásico desarrollan resistencia a trastuzumab. Por lo tanto, existe la necesidad de predecir mejor la respuesta a la terapia.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un método implementado por ordenador según se establece en la reivindicación 1. En algunas realizaciones, el método implementado por ordenador accede a la agresividad de un cáncer de mama en un sujeto detectando el nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y HerH2 fosforilado (pHer2) en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto, y comparando el nivel de expresión de proteína con un valor de referencia. En diversas realizaciones, el método es capaz de discriminar entre un tumor Her2(2+) y un tumor Her2(3+).

En algunas realizaciones, el método accede a la eficacia de un tratamiento de un régimen de tratamiento de un sujeto que tiene cáncer de mama mediante la detección del nivel de expresión proteica de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto, y comparando el nivel de expresión de proteína con un valor de referencia.

En algunas realizaciones, el método supervisa un régimen de tratamiento de un sujeto con cáncer de mama mediante la detección del nivel de expresión proteica de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de tumor del sujeto en un primer periodo de tiempo; detectando el nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto en un segundo periodo de tiempo y comparando la cantidad de expresión de proteína detectada en el primer periodo de tiempo con la cantidad detectada en la etapa en un segundo periodo de tiempo o con un valor de referencia.

En algunas realizaciones, el método determina si un sujeto con cáncer de mama se beneficiará de un régimen de tratamiento detectando el nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto, y comparando el nivel de expresión de proteína con un valor de referencia.

En algunas realizaciones, el método predice la capacidad de supervivencia de un sujeto diagnosticado de cáncer de mama detectando el nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto, y comparando el nivel de expresión de proteína con un valor de referencia.

En algunas realizaciones, el método determina la cantidad de p95HER2 en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto, detectando el nivel de expresión de proteína de TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en la muestra; combinando los niveles de expresión de Her2 y pHer2 para producir un valor combinado; y restando el nivel de expresión de TAB250 del valor combinado. Mediante la determinación de la cantidad de pHER2 en la muestra, se puede determinar la sensibilidad o resistencia a Herceptin permitiendo seleccionar la terapia apropiada.

El tratamiento puede ser, por ejemplo, terapia biológica tal como lapatainib, trastuzumab o bevacizumab. El nivel de expresión de la proteína puede ser detectado por inmunofluorescencia.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema según se expone en la reivindicación 14.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que se dirige la presente invención.

Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación, se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En el caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una curva ROC que muestra un modelo multivariado de IF Her2 e IF pHer2 para distinguir entre Her2 2+ (HercepTest) de especímenes tumorales (individuos) Her2 3+ (HercepTest).
La Figura 2 es una curva ROC que muestra la inmunofluorescencia (IF) de c-erbB2 HER2 para distinguir entre Her2 (+) 2+ (HercepTest) de individuos Her2 3+ (HercepTest).
La Figura 3 es una curva ROC que muestra un modelo multivariado de IF Her2 (c-erbB2) como la única característica seleccionada para distinguir Her2 FISH + de especímenes tumorales (individuos) Her2 FISH (-).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a la identificación de biomarcadores asociados con cáncer de mama. Se describe en el presente documento un ensayo cuantitativo inmunofluorescente multiplex para Her-2 en muestras de tumor de mama embebidas en parafina fijadas con formalina. El ensayo es útil para el fenotipado del tumor, la estratificación del paciente y la indicación terapéutica. También se describen en el presente documento sistemas y aparatos que usan información clínica, información molecular e información morfométrica generada por ordenador en un modelo predictivo para predecir la aparición, respuesta al tratamiento o supervivencia de un sujeto con cáncer de mama.

La metodología del sistema representa una plataforma integradora que se basa en principios de aprendizaje mecánico para combinar datos clínicos, con características cuantitativas de biomarcadores. Mediante la aplicación de un enfoque analítico de sistemas, se genera un perfil único, específico de tumor y paciente, a través de tecnologías de diapositivas en análisis de imágenes, histomorfometría e inmunofluorescencia espectral multiplex (IF), usando secciones de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina. Los modelos matemáticos se incorporan al umbral y luego normalizan los (bio) marcadores individuales y múltiples en una sección de tejido dada que permite una evaluación precisa de cualquier marcador dado a través de múltiples muestras de pacientes. Una ventaja distintiva es que la microanatomía histológica está intacta y las firmas de proteínas están directamente asociadas con un tipo celular específico.

Por consiguiente, la descripción proporciona métodos para determinar la capacidad de respuesta, por ejemplo, la sensibilidad o resistencia de una célula cancerosa a un agente terapéutico, por ejemplo, quimioterapia, radiación ionizante o inmunoterapia, determinando el nivel de expresión de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 Hcr2-ECD), c-crb B2 (Hcr2) y Her 2 fosforilado (pHcr2) en una muestra obtenida de un paciente. Estos métodos también son útiles para supervisar sujetos sometidos a tratamientos y terapias para cáncer de mama, y para seleccionar terapias y tratamientos que serán eficaces en sujetos con cáncer de mama, donde la selección y el uso de dichos tratamientos y terapias retardan el avance del cáncer de mama. Más específicamente, la descripción proporciona métodos para determinar si un paciente con cáncer de mama responderá a trastuzumab.

Definiciones

"Precisión" se refiere al grado de conformidad de una magnitud medida o calculada (un valor de ensayo informado) con su valor real (o verdadero). La precisión clínica se refiere a la proporción de resultados verdaderos (positivos verdaderos (TP) o negativos verdaderos (TN) frente a los resultados erróneamente clasificados (falsos positivos (FP) o falsos negativos (FN)), y se puede expresar como una sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos (VPP) o valores predictivos negativos (VPN), o como probabilidad, razón de oportunidades, entre otras medidas.

El "biomarcador" en el contexto de la presente invención, incluye, sin limitación, proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos, junto con sus polimorfismos, mutaciones, variantes, modificaciones, subunidades, fragmentos, complejos proteína-ligando y productos de degradación, complejos proteína-ligando, elementos, metabolitos relacionados, y otros analitos o medidas derivadas de la muestra. Los biomarcadores también pueden incluir proteínas mutadas o ácidos nucleicos mutados.

Un "indicador clínico" es cualquier dato fisiológico usado en solitario o junto con otros datos para evaluar la condición fisiológica de una recopilación de células o de un organismo. Este término incluye indicadores preclínicos. Por ejemplo, en el contexto del cáncer de mama, el indicador clínico puede incluir datos que indiquen el tamaño del tumor, la multifocalidad, el estado del margen, la invasión vascular/perineural, la necrosis, el tipo histológico, el grado Bloom-Richardson, el pTNM y la patología asociada, incluyendo el componente intraductal, el cambio fibroquístico, y las microcalcificaciones.

Los "parámetros clínicos" incluyen todos los biomarcadores no muestrales o no analitos del estado de salud del sujeto u otras características, tales como, sin limitación, edad (Edad), etnia (RAZA), género (Sexo) o antecedentes familiares (FamHX).

"FN" es falso negativo, que para un ensayo de patología significa clasificar un sujeto de enfermedad incorrectamente como sin enfermedad o normal.

"FP" es falso positivo, que para un ensayo de patología significa clasificar un sujeto normal incorrectamente como con enfermedad.

Una "fórmula", "algoritmo" o "modelo" es cualquier ecuación matemática, proceso algorítmico, analítico o programado, o técnica estadística que toma una o más entradas continuas o categóricas (denominadas en lo sucesivo en el presente documento "parámetros"), y calcula un valor de salida, a veces denominado "índice" o "valor de índice". Los ejemplos no limitantes de "fórmulas" incluyen sumas, relaciones y operadores de regresión, tales como coeficientes o exponentes, transformaciones y normalizaciones de valores de biomarcadores (incluyendo, sin limitación, los esquemas de normalización basados en parámetros clínicos, tales como el sexo, la edad o el origen étnico), reglas y directrices, modelos de clasificación estadística, y redes neuronales entrenadas en poblaciones históricas. De particular utilidad en la combinación de biomarcadores son las ecuaciones lineales y no lineales y los análisis de clasificación estadística para determinar la relación entre los niveles de biomarcadores detectados en una muestra de sujeto y la respuesta del sujeto a la quimioterapia. En la construcción de paneles y combinaciones, son de interés particular los algoritmos de clasificación estadística estructural y sináptica y los métodos de construcción del índice de riesgo, utilizando características de reconocimiento de patrones, incluyendo técnicas establecidas tales como correlación cruzada, Análisis de Componentes Principales (PCA), rotación de factores, Regresión Logística (LogReg), Análisis Discriminante Lineal (LDA), Análisis Discriminante Lineal de Genes propios (ELDA), Máquinas de Vectores de Soporte (SVM), Bosque Aleatorio (RF), Árbol de Partición Recursiva (RPART), así como otras técnicas de clasificación de árbol de decisión relacionadas, Centroides Encogidos (SC), StepAIC, Vecino Késimo-más cercano, Refuerzo, Árboles de Decisión, Redes Neuronales, Redes Bayesianas, Máquinas de Vectores de Soporte, y Modelos Ocultos de Markov, entre otros. Pueden usarse otras técnicas en el análisis de riesgo de supervivencia y tiempo para el evento, incluyendo modelos de Cox, Weibull, Kaplan-Meier y Greenwood bien conocidos por los expertos en la técnica. Muchas de estas técnicas son útiles bien combinadas con una técnica de selección de biomarcadores, tales como selección directa, selección inversa o selección escalonada, enumeración completa de todos los paneles potenciales de un tamaño dado, algoritmos genéticos, o pueden incluir metodologías de selección de biomarcadores en su propia técnica. Estos pueden acoplarse con criterios de información, tal como el Criterio de Información de Akaike (AIC) o el Criterio de Información de Bayes (BIC), con el fin de cuantificar la compensación entre biomarcadores adicionales y la mejora del modelo, y ayudar a minimizar el exceso. Los modelos predictivos resultantes pueden ser validados en otros estudios, o validados de forma cruzada en el estudio en el que fueron originalmente entrenados, usando técnicas como Arranque, Validación Omitiendo Uno (LOO) y validación cruzada 10 veces (CV 10 veces). En diversas etapas, las tasas de descubrimiento falso pueden estimarse mediante la permutación de valores según técnicas conocidas en la técnica. Una "función de utilidad económica de la salud" es una fórmula que se deriva de una combinación de la probabilidad esperada de una gama de resultados clínicos en una población de pacientes aplicada idealizada, tanto antes como después de la introducción de una intervención diagnóstica o terapéutica en el estándar de atención. Incluye estimaciones de las características de exactitud, eficacia y rendimiento de tal intervención, y una medición (una utilidad) del coste y/o valor asociada con cada resultado, que puede derivarse de los costes reales del sistema sanitario (servicios, suministros, dispositivos y fármacos, etc.) y/o como un valor estimado aceptable por año ajustado a la calidad de vida (QALY) que tiene lugar en cada resultado. La suma, a través de todos los resultados previstos, del producto del tamaño de la población pronosticada para un resultado multiplicado por la utilidad esperada de los resultados respectivos es la utilidad económica sanitaria total de un estándar dado de la atención. La diferencia entre (i) la utilidad económica total sanitaria calculada para el estándar de atención con la intervención frente a (ii) la utilidad económica sanitaria total para el estándar de atención sin la intervención da como resultado una medida global del coste económico sanitario o el valor de la intervención. Esto puede dividirse entre todo el grupo de pacientes que se está analizando (o solamente entre el grupo de intervención) para llegar a un coste por unidad de intervención, y para guiar dichas

decisiones como posicionamiento en el mercado, precios y supuestos de aceptación del sistema de salud. Dichas funciones de utilidad económica sanitaria se usan comúnmente para comparar la rentabilidad de la intervención, pero también pueden ser transformadas para estimar el valor aceptable por QALY que el sistema de salud está dispuesto a pagar, o las características de rendimiento clínico rentables requeridas de una nueva intervención.

Para las intervenciones diagnósticas (o pronósticas) de la invención, ya que cada resultado (que en una prueba diagnóstica clasificadora de la enfermedad puede ser un TP, FP, TN o FN) tiene un coste diferente, una función de utilidad económica sanitaria puede favorecer preferiblemente la sensibilidad frente a la especificidad, o PPV sobre NPV en base a la situación clínica y los costes y el valor de los resultados individuales y, por lo tanto, proporciona otra medida del rendimiento y el valor económico sanitario que puede ser diferente de las medidas de rendimiento clínicas o analíticas más directas. Estas diferentes mediciones y compromisos relativos generalmente convergerán sólo en el caso de un ensayo perfecto, con tasa de error cero (también conocida como, errores de clasificación de resultados del sujeto predichos nulos o FP y FN), que todas las medidas de rendimiento favorecerán más la imperfección, pero a diferentes grados.

El "estado Her2", en la práctica rutinaria, incluye inmunohistoquímica e hibridación fluorescente in situ (FISH). La inmunohistoquímica se utiliza como método de cribado para determinar el nivel de expresión de la proteína Her2 en cánceres de mama y los resultados inmunohistoquímicos de Her2 se expresan generalmente en un sistema de puntuación de cuatro escalas que varía de 0 a 3+. Los criterios de puntuación en este sistema comprenden el porcentaje de células tumorales positivas y la calidad de tinción que incluye la intensidad de la tinción y el tipo de tinción de la membrana. Según ensayos clínicos, el consenso de expertos y la US Food and Drug Administration (FDA) y las recientes recomendaciones de la American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAPs), un cáncer de mama invasivo con una puntuación de Her2 3+ positivo es considerado un tumor Her2 positivo, es decir, el paciente es apto para la terapia con Trastuzumab. Además, las muestras marcadas como Her2 2+ se consideran Her2 equívoca y se deben ensayar con un ensayo validado para la amplificación del gen HER2.

"Medir" o "medición", o como alternativa, "detectar" o "detección", significa evaluar la presencia, ausencia, o cantidad (que puede ser una cantidad eficaz) de una sustancia dada dentro de una muestra clínica o derivada de sujeto, incluyendo la derivación de niveles de concentración cualitativa o cuantitativa de tales sustancias, o evaluando de otra manera los valores o la categorización de los parámetros clínicos no analitos de un sujeto.

El "valor predictivo negativo" o "NPV" se calcula mediante TN/(TN + FN) o la fracción negativa verdadera de todos los resultados negativos del ensayo. También se ve inherentemente afectado por la prevalencia de la enfermedad y la probabilidad de del ensayo previo de la población que se pretende ensayar. Véase, por ejemplo, O'Marcaigh AS, Jacobson RM, "Estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results", Clin. Ped. 1993, 32(8): 485-491, que analiza la especificidad, sensibilidad y valores predictivos positivos y negativos de un ensayo, por ejemplo, un ensayo de diagnóstico clínico. A menudo, para los enfoques de clasificación de patología binarios se utiliza una medición continua del ensayo diagnóstico, la sensibilidad y la especificidad se resumen por las curvas de características operativas del receptor (ROC) de acuerdo con Pepe et al, "Limitations of the Odds Ratio in Gauging the Performance of a Diagnostic, Prognostic, or Screening Marker", Am. J. Epidemiol 2004, 159 (9): 882-890, y se resumen por el área bajo la curva (AUC) o estadística de c, un indicador que permite la representación de la sensibilidad y especificidad de una prueba, ensayo o método sobre toda la gama de puntos de corte de prueba (o ensayo) con un único valor. Véase también, por ejemplo, Shultz, "Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures", chapter 14 in Teitz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis and Ashwood (eds.), 4ª edición 1996, W.B. Saunders Company, páginas 192-199; y Zweig et al., "ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Subjects With Coronary Artery Disease", Clin. Chem., 1992, 38(8): 1425-1428. Un enfoque alternativo que utiliza funciones de probabilidad, razones de oportunidades, teoría de la información, valores predictivos, calibración (incluyendo bondad de ajuste), y las mediciones de reclasificación se resume de acuerdo con Cook, "Use and Misuse of the Receiver Operating Characteristic Curve in Risk Prediction", Circulation 2007, 115: 928-935. Por último, las razones de riesgo y las razones de riesgo absoluto y relativo dentro de las cohortes de sujetos que se definen por un ensayo son una medida adicional de la precisión y la utilidad clínica. Con frecuencia, se usan métodos múltiples para definir valores anormales o de enfermedad, incluyendo límites de referencia, límites de discriminación y umbrales de riesgo.

"Precisión analítica" se refiere a la reproducibilidad y previsibilidad del propio proceso de medición, y puede resumirse en mediciones tales como coeficientes de variación, y ensayos de concordancia y calibración de las mismas muestras o controles con diferentes tiempos, usuarios, equipos y/o reactivos. Estas y otras consideraciones en la evaluación de nuevos biomarcadores también se resumen en Vasan, 2006.

"Rendimiento" es un término que se refiere a la utilidad global y la calidad de una prueba diagnóstica o pronóstica, incluyendo, entre otras, la precisión clínica y analítica, otras características analíticas y de proceso, tales como características de uso (por ejemplo, estabilidad, facilidad de uso), el valor económico sanitario y los costes relativos de los componentes del ensayo. Cualquiera de estos factores puede ser la fuente de un rendimiento superior y, por lo tanto, de la utilidad del ensayo, y puede medirse mediante "métricas de rendimiento" apropiadas tales como AUC, tiempo de resultado, semivida, etc.

El "valor predictivo positivo" o "PPV" se calcula mediante TP/(TP + FP) o la fracción positiva verdadera de todos los resultados positivos del ensayo. Se ve inherentemente afectado por la prevalencia de la enfermedad y la probabilidad de del ensayo previo de la población que se pretende ensayar.

"Riesgo" en el contexto de la presente invención, se refiere a la probabilidad de que un evento ocurra durante un período de tiempo específico, como en la respuesta al tratamiento, la recidiva o supervivencia del cáncer, y puede significar un riesgo "absoluto" o riesgo "relativo" de un sujeto. El riesgo absoluto puede medirse con referencia a la observación real después de la medición para la cohorte de tiempo pertinente, o con referencia a los valores de índice elaborados a partir de cohortes históricas estadísticamente válidas que se han seguido durante el período de tiempo pertinente. El riesgo relativo se refiere a la proporción de riesgos absolutos de un sujeto en comparación con los riesgos absolutos de cohortes de bajo riesgo o con un riesgo poblacional promedio, que puede variar según la forma en que se evalúan los factores de riesgo clínicos. Las razones de oportunidades, la proporción de eventos positivos con respecto a eventos negativos para un resultado de ensayo dado, también se usan comúnmente (las oportunidades son según la fórmula p/(1-p) donde p es la probabilidad del evento y (1-p) es la probabilidad de ningún evento) con respecto a ninguna conversión.

La "evaluación del riesgo" en el contexto de la presente invención incluye hacer una predicción de la probabilidad, oportunidad o posibilidad de que se produzca un evento o patología, la tasa de aparición del evento o la conversión de una patología. La evaluación del riesgo también puede comprender la predicción de los parámetros clínicos futuros, los valores del factor de riesgo de laboratorio tradicionales u otros índices de cáncer, ya sea en términos absolutos o relativos en referencia a una población previamente medida. Los métodos de la presente invención pueden usarse para realizar mediciones continuas o categóricas de la capacidad de respuesta al tratamiento, diagnosticando y definiendo así el espectro de riesgo de una categoría de sujetos definidos como respondedores o no respondedores. En el escenario categórico, la invención puede usarse para discriminar entre cohortes de sujetos normales y otras con mayor riesgo de responder. Dicho uso diferente puede requerir diferentes combinaciones de biomarcadores y paneles individualizados, algoritmos matemáticos y/o puntos de corte, pero estar sujeto a las mismas medidas mencionadas anteriormente de precisión y rendimiento para el uso pretendido respectivo.

La "sensibilidad" se calcula mediante TP/(TP + FN) o la fracción positiva verdadera de los sujetos de la enfermedad.

La "especificidad" se calcula mediante TN/(TN+FP) o la fracción negativa verdadera de sujetos sin enfermedad o normales.

Por "estadísticamente significativo", se refiere a que la alteración es mayor de lo que podría esperarse que ocurriera por casualidad solamente (lo que podría ser un "falso positivo"). La significación estadística puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Las mediciones de significación usadas comúnmente incluyen el valor de p, que presenta la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como un punto de datos dado, suponiendo que el punto de datos fue el resultado de la casualidad solamente. Un resultado se considera altamente significativo a un valor de p de 0,05 o menos. Preferiblemente, el valor de p es 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 o menos.

Un "sujeto" en el contexto de la presente invención es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano, un primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca, pero no se limitan a estos ejemplos. Los mamíferos distintos de los seres humanos se pueden utilizar ventajosamente como sujetos que representan modelos animales de cáncer. Un sujeto puede ser de sexo masculino o femenino.

"TN" es verdaderamente negativo, lo que para una prueba de patología significa clasificar correctamente un sujeto sin enfermedad o normal.

"TP" es verdaderamente positivo, lo que para una prueba de patología significa clasificar correctamente un sujeto de la enfermedad.

Los "factores de riesgo de laboratorio tradicionales" corresponden a biomarcadores aislados o derivados de

muestras de sujeto y que actualmente se evalúan en el laboratorio clínico y se usan en algoritmos tradicionales de evaluación de riesgos globales. Los factores de riesgo tradicionales de laboratorio para la recidiva tumoral incluyen, por ejemplo, índice proliferativo, linfocitos infiltrantes de tumores. Se conocen otros factores de riesgo de laboratorio tradicionales para la recidiva tumoral por los expertos en la técnica.

Métodos y usos de la invención

Los métodos descritos en el presente documento se usan con sujetos sometidos a tratamiento y/o terapias para un cáncer de mama, sujetos que están en riesgo de desarrollar una recidiva de cáncer de mama, y sujetos que han sido diagnosticados con cáncer de mama. Los métodos de la presente invención se usan para monitorizar o seleccionar un régimen de tratamiento para un sujeto que tiene un cáncer de mama, y para evaluar la supervivencia prevista y/o el tiempo de supervivencia de un sujeto diagnosticado con cáncer de mama. Los regímenes de tratamiento incluyen, por ejemplo, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y combinaciones de los mismos.

La respuesta (por ejemplo, resistencia o sensibilidad) de un cáncer de mama a la quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y las combinaciones de las mismas se determina midiendo el nivel de expresión de un biomarcador en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra derivada de sujeto), y comparando los niveles de expresión con valores de referencia o de índice, a menudo utilizando algoritmos matemáticos o una fórmula para combinar la información de los resultados de múltiples biomarcadores individuales y de parámetros clínicos/indicadores clínicos sin analitos en una única medición o índice. El biomarcador es, por ejemplo, AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2). Los indicadores clínicos incluyen, por ejemplo, datos que indican el tamaño del tumor, la multifocalilidad, el estado del margen, la invasión vascular/perineural, la necrosis, el tipo histológico, el grado Bloom-Richardson, el pTNM y la patología asociada, incluyendo el componente intraductal, el cambio fibroquístico, y las microcalcificaciones. La muestra es, por ejemplo, una muestra de tejido tumoral fijada en formalina y embebida en parafina.

Por resistencia se refiere al de una célula para responder a un agente. Por ejemplo, la resistencia a un fármaco quimioterapéutico, la radiación ionizante, la inmunoterapia significa que la célula no está dañada o eliminada por el fármaco. Por sensibilidad se entiende que la célula responde a un agente. Por ejemplo, la sensibilidad a un fármaco quimioterapéutico, radiación o inmunoterapia significa que la célula está dañada o eliminada por el fármaco.

Los métodos de la presente invención son útiles para tratar, monitorizar el avance de o predecir la respuesta a la terapia en un sujeto diagnosticado de cáncer de mama.

Los niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) permiten determinar si un sujeto obtendrá un beneficio de un determinado transcurso de tratamiento. En este método, se proporciona una muestra biológica de un sujeto antes de someterse a tratamiento, por ejemplo, quimioterapéutico, radiación o inmunoterapia para cáncer de mama. Por "obtener un beneficio" se entiende que el sujeto responderá al transcurso del tratamiento. Por responder se entiende que en el tratamiento hay una disminución en el tamaño, la prevalencia o el potencial metastásico de un cáncer de mama en un sujeto. Cuando el tratamiento se aplica profilácticamente, "responder" significa que el tratamiento retrasa o evita que un cáncer de mama o una recidiva de cáncer de mama se forme o retrasa, evita o alivia un síntoma de cáncer de mama clínico. Las evaluaciones de los cánceres de mama se realizan utilizando protocolos clínicos estándar.

Si se desea, se obtienen muestras biológicas del sujeto en diversos puntos temporales antes, durante o después del tratamiento. A continuación, se determinan los niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) y se comparan con un valor de referencia, por ejemplo, un individuo o población de control cuyo estado de cáncer de mama es conocido o un valor de índice. La muestra de referencia o el valor del índice pueden tomarse o derivarse de uno o más individuos que han sido expuestos al tratamiento. Como alternativa, la muestra de referencia o el valor del índice pueden tomarse o derivarse de uno o más individuos que no han sido expuestos al tratamiento. Por ejemplo, las muestras pueden ser recogidas de sujetos que han recibido tratamiento inicial para el trastorno de cáncer de mama y tratamiento posterior para cáncer de mama para controlar el progreso del tratamiento.

Un valor de referencia puede ser relativo a un número o valor derivado de estudios de población, incluyendo, sin limitación, dichos sujetos que tienen el mismo cáncer, sujetos que tienen el mismo o similar rango de edad, sujetos del mismo grupo étnico o similar, sujetos que tienen antecedentes familiares de cáncer, o en relación con la muestra inicial de un sujeto sometido a tratamiento para un cáncer. Dichos valores de referencia pueden derivarse de análisis estadísticos y/o datos de predicción de riesgo de poblaciones obtenidas a partir de algoritmos matemáticos e índices calculados de recidiva de cáncer. Los índices de referencia también pueden construirse y utilizarse utilizando

algoritmos y otros métodos de clasificación estadística y estructural.

En una realización de la presente invención, el valor de referencia es la cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que responden a la quimioterapia en el cáncer de mama. En otra realización de la presente invención, el valor de referencia es la cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que tienen mayor tasa de supervivencia libre de enfermedad o de supervivencia global de cáncer de mama. En la otra realización de la presente invención, el valor de referencia es la cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que no están en riesgo o tienen bajo riesgo de desarrollar una recidiva de un cáncer de mama. En una realización adicional, dichos sujetos son monitorizados y/o revisados periódicamente durante un periodo de tiempo relevante desde el punto de vista del diagnóstico ("estudios longitudinales") después de dicha prueba para verificar la ausencia continuada de cáncer de mama (libre de enfermedad o supervivencia global). Dicho período puede ser de un año, dos años, de dos a cinco años, cinco años, de cinco a diez años, diez años o diez o más años a partir de la fecha de la prueba inicial para la determinación del valor de referencia. Además, la medición retrospectiva de la expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2), en muestras de sujetos acumuladas históricas apropiadas se puede usar para establecer estos valores de referencia, acortando así el tiempo de estudio requerido.

Un valor de referencia puede comprender también la cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) que se obtienen de sujetos que muestran una mejora en los factores de riesgo como resultado de tratamientos y/o terapias para el cáncer. Un valor de referencia puede comprender también la cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) que se obtienen de sujetos que muestran una mejora en la capacidad de respuesta a la terapia como resultado de tratamientos y/o terapias para el cáncer. Un valor de referencia también puede comprender las cantidades de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) que se obtienen de sujetos que tienen una mayor tasa libre de enfermedad/global, o están en alto riesgo de desarrollar cáncer de mama, o que han sufrido cáncer de mama.

En otra realización, el valor de referencia es un valor de índice o un valor inicial. Un valor de índice o valor inicial es un nivel de muestra compuesto de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) de uno o más sujetos que no tienen un cáncer de mama o sujetos que son asintomáticos a un cáncer de mama. Un valor inicial también puede comprender el nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra derivada de un sujeto que ha mostrado una mejora en la respuesta del cáncer de mama a la terapia o la tasa de supervivencia libre de enfermedad/general como resultado de tratamientos o terapias contra el cáncer. En esta realización, para hacer comparaciones con la muestra derivada del sujeto, las cantidades de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) se calculan y se comparan de forma similar al valor del índice. Opcionalmente, los sujetos identificados con cáncer de mama, o que están en mayor riesgo de desarrollar un cáncer de mama se eligen para recibir un régimen terapéutico para retardar el avance del cáncer, o disminuir o prevenir el riesgo de desarrollar un cáncer de mama.

La progresión de un cáncer de mama, o la eficacia de un régimen de tratamiento de cáncer puede monitorizarse detectando el nivel de expresión de proteína de muestras de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pH2) obtenidas de un sujeto a lo largo del tiempo y comparando la cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2). Por ejemplo, se puede obtener una primera muestra antes de que el sujeto reciba el tratamiento y se toman una o más muestras posteriores después o durante el tratamiento del sujeto. El cáncer se considera progresivo (o, como alternativa, el tratamiento no previene el avance) si la cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) cambia con el tiempo en relación con el valor de referencia, mientras que el cáncer no es progresivo si la cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) permanece constante con el tiempo (en relación con la población de referencia, o "constante" como se utiliza en el presente documento). El término "constante", como se utiliza en el contexto de la presente invención, se considera que incluye cambios en el tiempo con respecto al valor de referencia.

También se proporciona un método para evaluar cambios en la capacidad de respuesta a la terapia o la tasa de supervivencia libre de enfermedad/supervivencia global en un sujeto diagnosticado con cáncer, detectando el nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2 -CED), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una primera muestra del sujeto en un primer periodo de tiempo, detectando el nivel de expresión de

proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una segunda muestra del sujeto en un segundo periodo de tiempo, y comparando las cantidades de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD) c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) detectados en el primer y segundo períodos de tiempo.

Indicaciones diagnósticas, predictivas y pronósticas de la invención

La cantidad de proteína AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) puede ser medida en una muestra de ensayo y comparada con el "nivel de control normal", utilizando técnicas tales como límites de referencia, límites de discriminación, o umbrales que definen el riesgo para definir puntos de corte y valores anormales. Como alternativa, el nivel de control normal puede ser una base de datos de patrones de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) de sujetos previamente sometidos a pruebas que respondieron a la quimioterapia, terapia o inmunoterapia en un horizonte temporal clínicamente relevante.

La presente invención puede usarse para realizar mediciones continuas o categóricas de la respuesta a la quimioterapia o supervivencia del cáncer, diagnosticando y definiendo así el espectro de riesgo de una categoría de sujetos definidos como en riesgo de no responder a la quimioterapia. En el escenario categórico, los métodos de la presente invención pueden usarse para discriminar entre las cohortes de sujetos respondedores al tratamiento y no respondedores al tratamiento. En otras realizaciones, la presente invención puede usarse para discriminar a aquellos que tienen un potencial de supervivencia mejorado.

La identificación del sujeto que será sensible a la terapia permite la selección e iniciación de diversas intervenciones terapéuticas o regímenes de tratamiento para aumentar el potencial de supervivencia del individuo. En este método, se puede proporcionar una muestra biológica de un sujeto sometido a regímenes de tratamiento, por ejemplo, tratamientos con fármacos para el cáncer. Si se desea, se obtienen muestras biológicas del sujeto en diversos puntos temporales antes, durante o después del tratamiento. Por ejemplo, la descripción proporciona métodos para identificar pacientes que deben recibir lapatninib (Tykerb). Lapatninib es un inhibidor de cinasa doble de molécula pequeña que parece funcionar bien en estos tumores resistentes que tienen pHer2 alto.

En ciertas realizaciones, los métodos de la invención son capaces de predecir la supervivencia y/o el tiempo de supervivencia de un sujeto diagnosticado con cáncer de mama, en el que se predice que el sujeto vivirá 3 meses, 6 meses, 12 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años, 6 años, 7 años, 8 años, 9 años, 10 años, 15 años, 20 años, 30 años, 40 años o 50 años a partir de la fecha del diagnóstico o fecha o inicio de un régimen terapéutico para el tratamiento del cáncer de mama.

En la presente invención también se puede usar para determinar la cantidad de p95HER2 en una muestra de tejido tumoral fijada en formalina, embebida en parafina del sujeto. Por ejemplo, por el nivel de expresión de proteína de TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) se detecta en la muestra y los niveles de expresión de Her2 y pHer2 se combinan para producir un valor combinado. El nivel de expresión de TAB250 se resta del valor combinado. Mediante la determinación de la cantidad de pHER2 en la muestra, se puede determinar la sensibilidad o resistencia a Herceptin permitiendo seleccionar la terapia apropiada.

La presente invención también se puede usar para seleccionar poblaciones de pacientes o sujetos en cualquier número de configuraciones. Por ejemplo, una organización de mantenimiento sanitaria, una entidad de salud pública o un programa de salud escolar puede seleccionar un grupo de sujetos para identificar aquellos que requieren intervenciones, como se describió anteriormente, o para la recopilación de datos epidemiológicos. Las compañías de seguros (por ejemplo, de salud, de vida o de discapacidad) pueden seleccionar solicitantes en el proceso de determinar la cobertura o los precios, o los clientes existentes para una posible intervención. Los datos recogidos en tales selecciones de población, particularmente cuando están ligados a cualquier progresión clínica con respecto a condiciones como cáncer o progresión del cáncer, serán de valor en las operaciones de, por ejemplo, las organizaciones de mantenimiento sanitarias, los programas de salud pública y las compañías de seguros. Dichas matrices o recopilaciones de datos pueden almacenarse en medios legibles por máquina y utilizarse en cualquier número de sistemas de gestión de datos relacionados con la salud para proporcionar servicios sanitarios mejorados, asistencia sanitaria rentable, un mejor funcionamiento de seguros, etc. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0038227; Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º US 2004/0122296; Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º US 2004/ 0122297; y la Patente de Estados Unidos N.º 5.018.067. Dichos sistemas pueden acceder a los datos directamente desde el almacenamiento interno de datos o remotamente desde uno o más sitios de almacenamiento de datos como se detalla adicionalmente en el presente documento.

Cada programa puede ser implementado en un lenguaje de programación de procedimiento de alto nivel u orientado a objetos para comunicarse con un sistema informático. Sin embargo, los programas se pueden implementar en el lenguaje de ensamblaje o de máquina, si se desea. El lenguaje puede ser un lenguaje compilado o interpretado. Cada programa informático de este tipo se puede almacenar en un medio o dispositivo de almacenamiento (por ejemplo, ROM o disquete magnético u otros como se define en otra parte de esta descripción) legible por un ordenador programable de uso general o especial, para configurar y manejar el ordenador cuando el medio de almacenamiento o dispositivo es leído por el ordenador para realizar los procedimientos descritos en el presente documento. El sistema de gestión de datos relacionado con la salud de la invención también puede considerarse implementado como un medio de almacenamiento legible por ordenador, configurado con un programa de ordenador, en el que el medio de almacenamiento configurado de este modo hace que un ordenador funcione de una manera específica y predefinida para realizar diversas funciones descritas en el presente documento.

Medidas de rendimiento y precisión de la invención

El rendimiento y, por lo tanto, la utilidad clínica absoluta y relativa de la invención, se pueden evaluar de múltiples maneras como se ha indicado anteriormente. Entre las diversas evaluaciones de rendimiento, la invención pretende proporcionar precisión en el diagnóstico clínico y el pronóstico. La precisión de una prueba de diagnóstico, predicción o pronóstico, un ensayo o un método se refiere a la capacidad de la prueba, el ensayo o el método para distinguir entre sujetos que responden al tratamiento quimioterapéutico y los que no, se basa en si los sujetos tienen una "cantidad eficaz" o una" alteración significativa "en los niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2). Por "cantidad eficaz" o "alteración significativa" se entiende que la medición de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) es diferente del punto de corte predeterminado (o valor umbral) y, por lo tanto, indica la capacidad de respuesta del sujeto a la terapia o la supervivencia libre de enfermedad/general. La diferencia en el nivel de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) entre normal y anormal es preferiblemente estadísticamente significativa.

En el diagnóstico categórico de una patología, cambiar el punto de corte o el valor umbral de una prueba (o ensayo) usualmente cambia la sensibilidad y la especificidad, pero en una relación cualitativamente inversa. Por lo tanto, al evaluar la exactitud y utilidad de una prueba médica, ensayo o método propuesto para evaluar la afección de un sujeto, se debe tener siempre en cuenta tanto la sensibilidad como la especificidad y tener en cuenta cuál es el punto de corte en el que la sensibilidad y la especificidad se notifican ya que la sensibilidad y la especificidad pueden variar significativamente en el intervalo de puntos de corte. El uso de estadísticas tales como AUC, que incluye todos los posibles valores de punto de corte, se prefiere para la mayoría de las medidas de riesgo categóricas que usan la invención, mientras que para las medidas de riesgo continuo se prefieren las estadísticas de bondad de ajuste y calibración a los resultados observados u otros estándares de oro.

El uso de tales estadísticas, un "grado aceptable de precisión diagnóstica", se define en el presente documento como una prueba o ensayo (tal como la prueba para determinar la presencia clínicamente significativa de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD) c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) en el que el AUC (área bajo la curva ROC para la prueba o ensayo) es al menos 0,60, deseablemente al menos 0,65, más deseablemente al menos 0,70, preferiblemente al menos 0,75, más preferiblemente al menos 0,80 y mucho más preferiblemente al menos 0,85.

Por un "grado muy alto de precisión diagnóstica", se refiere a una prueba o ensayo en el que el AUC (área bajo la curva ROC para la prueba o ensayo) es al menos 0,80, deseablemente al menos 0,85, más deseablemente al menos 0,875, preferiblemente al menos 0,90, más preferiblemente al menos 0,925 y mucho más preferiblemente al menos 0,95.

El valor predictivo de cualquier prueba depende de la sensibilidad y especificidad de la prueba, y de la prevalencia de la afección en la población que se está ensayando. Esta noción, basada en el teorema de Bayes, establece que cuanto mayor sea la probabilidad de que la afección examinada esté presente en un individuo o en la población (probabilidad de pre-prueba), mayor será la validez de una prueba positiva y mayor será la probabilidad que el resultado sea un verdadero positivo. Por lo tanto, el problema con el uso de una prueba en cualquier población donde hay una baja probabilidad de que la afección esté presente es que un resultado positivo tiene un valor limitado (es decir, es más probable que sea un falso positivo). De manera similar, en las poblaciones de riesgo muy alto, un resultado negativo de la prueba es más probable que sea un falso negativo.

Como resultado, ROC y AUC pueden ser engañosos en cuanto a la utilidad clínica de una prueba en poblaciones con baja prevalencia de enfermedad (definidas como aquellas con menos del 1 % de casos (incidencia) por año, o menos del 10 % de prevalencia acumulada durante un horizonte temporal especificado). Como alternativa, se

pueden emplear relaciones de riesgo absoluto y riesgo relativo como se define en otra parte de esta descripción para determinar el grado de utilidad clínica. Las poblaciones de sujetos a ser examinados también pueden clasificarse en cuartiles por los valores de medición de la prueba, donde el cuartil superior (25 % de la población) comprende el grupo de sujetos con mayor riesgo relativo de falta de respuesta terapéutica, y el cuartil inferior que comprende el grupo de sujetos que tienen el menor riesgo relativo de falta de respuesta terapéutica. En general, se considera que los valores derivados de pruebas o ensayos que tienen más de 2,5 veces el riesgo relativo desde el cuartil superior al inferior en una población de baja prevalencia tienen un "alto grado de precisión diagnóstica", y aquellos con cinco a siete veces el riesgo relativo para cada cuartil se considera que tienen un "grado muy alto de precisión diagnóstica". No obstante, los valores derivados de pruebas o ensayos que tienen sólo de 1,2 a 2,5 veces el riesgo relativo para cada cuartil que siguen siendo clínicamente útiles son ampliamente utilizados como factores de riesgo para una enfermedad; tal es el caso con el colesterol total y para muchos biomarcadores inflamatorios con respecto a su predicción de eventos futuros. A menudo, tales pruebas de precisión diagnóstica inferior deben combinarse con parámetros adicionales para obtener umbrales clínicos significativos para la intervención terapéutica, como se hace con los índices de evaluación de riesgo global mencionados anteriormente.

Una función de utilidad económica sanitaria es otro medio más para medir el rendimiento y el valor clínico de una prueba dada, que consiste en ponderar los resultados de las pruebas categóricas potenciales basándose en medidas reales de valor clínico y económico para cada una. El rendimiento económico sanitario está estrechamente relacionado con la precisión, ya que una función de utilidad económica sanitaria asigna específicamente un valor económico para los beneficios de una clasificación correcta y los costes de la clasificación errónea de los sujetos sometidos a prueba. Como medida de rendimiento, no es raro que se requiera una prueba para alcanzar un nivel de rendimiento que dé como resultado un aumento en el valor económico sanitario por prueba (antes de los costes de las pruebas) en exceso del precio objetivo de la prueba.

En general, los métodos alternativos de la determinación de la exactitud diagnóstica se usan comúnmente para medidas continuas, cuando una categoría de enfermedad o categoría de riesgo aún no ha sido claramente definida por las sociedades médicas relevantes y la práctica de la medicina, donde los umbrales para uso terapéutico aún no están establecidos, o cuando no existe un estándar de oro para el diagnóstico de la pre-enfermedad. Para las medidas continuas de riesgo, las medidas de precisión diagnóstica para un índice calculado se basan típicamente en el ajuste de la curva y la calibración entre el valor continuo previsto y los valores reales observados (o un valor calculado de índice histórico) y utilizan medidas tales como R al cuadrado, estadísticas del valor de P de Hosmer-Lemeshow e intervalos de confianza. No es inusual que los valores predichos usando tales algoritmos sean indicados incluyendo un intervalo de confianza (usualmente el 90 % o 95 % de IC) basado en las predicciones de una cohorte histórica observada, como en la prueba para el riesgo de recidiva futura del cáncer de mama comercializada por Genomic Health, Inc. (Redwood City, California).

CONSTRUCCIÓN DE ALGORITMOS CLÍNICOS

Se puede usar cualquier fórmula para combinar resultados en índices útiles en la práctica de la invención. Como se ha indicado anteriormente, y sin limitación, dichos índices pueden indicar, entre las diversas indicaciones diferentes, la probabilidad, posibilidad, oportunidad absoluta o relativa de responder a quimioterapia o quimiorradioterapia. Esto puede ser para un período de tiempo o un horizonte específico, o para el resto del riesgo de por vida, o simplemente proporcionarse como un índice relativo a otra población de sujetos de referencia.

Aunque aquí se describen diversas fórmulas preferidas, son bien conocidos por un experto en la técnica varios otros tipos de modelos y fórmulas más allá de las mencionadas en el presente documento y en las definiciones anteriores. El tipo de modelo real o fórmula utilizada puede seleccionarse a partir del campo de modelos potenciales basándose en el rendimiento y las características de precisión diagnóstica de sus resultados en una población de entrenamiento. Los detalles específicos de la propia fórmula pueden derivarse comúnmente de los resultados en la población de entrenamiento pertinente. Entre otros usos, tal fórmula puede estar destinada a mapear el espacio de características derivado de uno o más aportes a un conjunto de clases de sujetos (por ejemplo, útiles para predecir la pertenencia a clases de los sujetos como normales, respondedores y no respondedores), para derivar una estimación de una función de probabilidad del riesgo utilizando un enfoque bayesiano (por ejemplo, el riesgo de cáncer o un evento metastásico), o para estimar las probabilidades condicionales de clase, a continuación, utilizar la regla de Bayes para producir la función de probabilidad de clase como en el caso anterior.

Las fórmulas preferidas incluyen la amplia clase de algoritmos de clasificación estadística y, en particular, el uso de análisis discriminantes. El objetivo del análisis discriminante es predecir la pertenencia a la clase de un conjunto previamente identificado de características. En el caso del análisis discriminante lineal (LDA), se identifica la combinación lineal de características que maximiza la separación entre grupos según algunos criterios. Las

características se pueden identificar para LDA utilizando un enfoque basado en genes propios con diferentes umbrales (ELDA) o un algoritmo de escalonamiento basado en un análisis multivariado de varianza (MANOVA). Se pueden realizar algoritmos de avance, retroceso y escalonamiento que minimizan la probabilidad de no separación basada en la estadística de Hotelling-Lawley.

El Análisis Discriminante Lineal basado en Genes propios (ELDA) es una técnica de selección de características desarrollada por Shen et al. (2006). La fórmula selecciona características (por ejemplo, biomarcadores) en un marco multivariado usando un análisis propio modificado para identificar características asociadas con los vectores propios más importantes. "Importante" se define como aquellos vectores propios que explican la mayor varianza en las diferencias entre las muestras que están tratando de clasificarse en relación con algún umbral.

Una máquina de vectores de soporte (SVM) es una fórmula de clasificación que intenta encontrar un hiperplano que separa dos clases. Este hiperplano contiene vectores de soporte, puntos de datos que están exactamente a la distancia del margen del hiperplano. En el caso probable de que no exista un hiperplano de separación en las dimensiones actuales de los datos, la dimensionalidad se expande enormemente proyectando los datos en dimensiones mayores adoptando las funciones no lineales de las variables originales (Venables y Ripley, 2002). Aunque no es necesario, el filtrado de funciones para SVM a menudo mejora la predicción. Se pueden identificar características (por ejemplo, biomarcadores) para una máquina de vector de soporte usando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW) para seleccionar las mejores características univariadas. Un bosque aleatorio (RF, Breiman, 2001) o partición recursiva (RPART, Breiman et al., 1984) también pueden usarse por separado o en combinación para identificar las combinaciones de biomarcadores más importantes. Tanto KW como RF requieren que se seleccionen una serie de características del total. RPART crea un único árbol de clasificación utilizando un subconjunto de biomarcadores disponibles.

Se puede usar otra fórmula para procesar previamente los resultados de la medición individual en formas más valiosas de información, antes de su presentación a la fórmula predictiva. Mucho más notablemente, se conoce bien por los expertos en la técnica la normalización de los resultados de los biomarcadores, utilizando transformaciones matemáticas comunes tales como funciones logarítmicas o logísticas, como posiciones normales u otras posiciones de distribución, en referencia a valores medios de una población, etc. De particular interés es un conjunto de normalizaciones basadas en Parámetros Clínicos tales como edad, sexo, raza o sexo, donde la fórmula específica se utiliza únicamente en sujetos dentro de una clase o combinando continuamente un Parámetro Clínico como entrada. En otros casos, los biomarcadores basados en analitos se pueden combinar en variables calculadas que se presentan posteriormente a una fórmula.

Además de los valores de parámetros individuales de un sujeto que son potencialmente normalizados, una fórmula predictiva global para todos los sujetos, o cualquier clase conocida de sujetos, puede ser recalibrada o ajustada de otra manera basándose en el ajuste para la prevalencia esperada de una población y los valores paramétricos de biomarcador medios, de acuerdo con la técnica descrita en D'Agostino et al, (2001) JAMA 286:180-187, u otras técnicas similares de normalización y recalibración. Dichas estadísticas de ajuste epidemiológico pueden ser capturadas, confirmadas, mejoradas y actualizadas continuamente a través de un registro de datos pasados presentados al modelo, que pueden ser legibles por máquina o de otro modo, o a veces mediante la consulta retrospectiva de muestras almacenadas o referencia a estudios históricos de tales parámetros y estadísticas. Ejemplos adicionales que pueden ser objeto de recalibración de fórmula u otros ajustes incluyen estadísticas usadas en estudios de Pepe, M.S. et al, 2004 sobre las limitaciones de las razones de posibilidades; Cook, N.R., 2007, relativo a las curvas ROC. Por último, el resultado numérico de una fórmula clasificadora en sí puede transformarse después del procesamiento por su referencia a una población clínica real y los resultados del estudio y los criterios de valoración observados, con el fin de calibrar el riesgo absoluto y proporcionar intervalos de confianza para variar los resultados numéricos de la fórmula clasificadora o de riesgo. Un ejemplo de esto es la presentación del riesgo absoluto, y los intervalos de confianza para ese riesgo, derivados utilizando un estudio clínico real, elegido con referencia a la salida de la fórmula de puntuación de recidiva en el producto Oncotype Dx de Genomic Health, Inc. (Redwood City, CA). Una modificación adicional consiste en ajustar las subpoblaciones más pequeñas del estudio basándose en la salida de la fórmula clasificadora o de riesgo y definidas y seleccionadas por sus Parámetros Clínicos, tal como la edad o el sexo.

COMBINACIÓN CON PARÁMETROS CLÍNICOS, INDICADORES CLÍNICOS, CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y MORFOMÉTRICAS

Cualquiera de los Parámetros Clínicos mencionados anteriormente puede usarse en la práctica de la invención como entrada para una fórmula o como un criterio de preselección que define una población relevante a medir usando un panel y fórmula de biomarcador particular. Como se ha indicado anteriormente, los Parámetros Clínicos también

pueden ser útiles en la normalización y preprocesamiento de biomarcadores, la construcción de paneles, la selección y derivación del tipo de fórmula, y el postprocesamiento del resultado de la fórmula. Un enfoque similar puede ser tomado con los Indicadores Clínicos, como una entrada a una fórmula o como un criterio de preselección. En el contexto del cáncer de mama, los indicadores clínicos pueden incluir datos que indiquen el tamaño del tumor, la multifocalilidad, el estado del margen, la invasión vascular/perineural, la necrosis, el tipo histológico, el grado Bloom-Richardson, el pTNM y la patología asociada, incluyendo el componente intraductal, el cambio fibroquístico, y las microcalcificaciones.

También se describen en el presente documento métodos y sistemas que usan información morfométrica generada por ordenador en solitario o en combinación con información clínica y/o información molecular en un modelo predictivo para predecir la aparición de una afección médica. Por ejemplo, la información morfométrica opcionalmente clínica, molecular y generada por ordenador se utiliza para predecir la agresividad del cáncer de mama y/o la respuesta a un protocolo de tratamiento particular. Estas predicciones pueden ser utilizadas por médicos u otros individuos para seleccionar, por ejemplo, un curso de tratamiento apropiado para un paciente y/o diagnosticar una afección médica en el paciente.

Por ejemplo, puede proporcionarse una herramienta analítica que incluye una máquina de vector de soporte (SVM) y/o una red neuronal que determina correlaciones entre características morfométricas clínicas, moleculares y generadas por ordenador y una afección médica. Las características correlacionadas pueden formar un modelo que puede usarse para predecir la aparición o recidiva de la afección. Por ejemplo, se puede utilizar una herramienta analítica para generar un modelo predictivo basado en datos para una cohorte de pacientes cuyos resultados con respecto a una afección médica (por ejemplo, tiempo hasta la recidiva del cáncer, la agresividad del cáncer, la respuesta a la terapia) son parcialmente conocidos. Después, el modelo puede usarse para evaluar datos para un nuevo paciente con el fin de predecir la aparición de la afección médica para el nuevo paciente. En algunas realizaciones, puede usarse sólo un subconjunto de los tres tipos de datos (por ejemplo, datos clínicos y morfométricos solamente) por la herramienta analítica para generar el modelo predictivo. Los datos clínicos, moleculares y/o morfométricos utilizados pueden incluir cualquier dato clínico, molecular y/o morfométrico que sea relevante para el diagnóstico, tratamiento y/o predicción de una afección médica.

Los datos morfométricos pueden incluir datos generados por ordenador que indican diversas propiedades estructurales y/o espectrales de, por ejemplo, muestras de tejido. En una realización, los datos morfométricos pueden incluir datos para características morfométricas de estroma, citoplasma, núcleos epiteliales, núcleos estroma, lumen, glóbulos rojos, artefactos tisulares, fondo tisular, o una combinación de los mismos. Se puede proporcionar un sistema de análisis de imágenes de tejido para obtener mediciones de las características morfométricas a partir de una imagen de tejido. Tal sistema puede ser el sistema MAGIC™ que usa el software Definiens Cellenger. Tal sistema puede recibir una imagen teñida con H&E como entrada, y puede emitir diversas mediciones de características morfométricas para objetos patológicos en la imagen. Las características clínicas pueden incluir o basarse en datos para uno o más pacientes, tales como edad, raza, peso, estatura, antecedentes médicos, genotipo y patología, donde la patología se refiere a las características clínicas y patológicas de estadificación y cualquier otra característica clínica recogida específicamente para el proceso de la enfermedad disponible. Generalmente, los datos clínicos son recogidos por un médico durante el transcurso del examen de un paciente y/o del tejido o células del paciente. Los datos clínicos también pueden incluir datos clínicos que pueden ser más específicos para un contexto médico particular. Por ejemplo, en el contexto del cáncer de mama, los datos clínicos pueden incluir datos que indican el tamaño del tumor, multifocalidad, afectación del margen quirúrgico, invasión vascular/perineural, necrosis, tipo histológico, grado de Bloom-Richardson, estado ganglionar, estado intraductal, estado fibroquístico, microcalcificaciones y/u otros datos clínicos que pueden ser más específicos para el cáncer de mama.

Las características moleculares pueden incluir o basarse en datos que indiquen la presencia, ausencia, aumento o disminución relativa o ubicación relativa de moléculas biológicas incluyendo ácidos nucleicos, polipéptidos, sacáridos, esteroides y otras moléculas pequeñas o combinaciones de las anteriores, por ejemplo, glicoproteínas y complejos proteína-ARN. Por ejemplo, se determinan los niveles de expresión de c-erb B2 (HER2), Her 2 fosforilada (pHer2), TAB250 (Her2-ECD), AE1/AE3 (citoqueratina) y p95HER. Los lugares en los que se miden estas moléculas pueden incluir glándulas, tumores, estroma y/u otras localizaciones, y pueden depender del contexto médico particular. En general, los datos moleculares se recopilan utilizando técnicas biológicas y bioquímicas moleculares comunes, incluyendo Southern, Western y Northern blots, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Además, la hibridación in situ puede usarse para mostrar tanto la abundancia relativa como la localización de las características biológicas moleculares. Se describen métodos y sistemas ilustrativos para hibridación in situ del tejido en la solicitud de patente de Estados Unidos N.º de Serie 10/624.233, presentada el 21 de julio de 2003 (ahora Pat. de Estados Unidos N.º 6,995,020), incorporada

anteriormente y titulada "Methods and compositions for the preparation and use of fixed-treated cell-lines and tissue in fluorescence in situ hybridization".

Medición de biomarcadores de proteínas

Las proteínas AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) pueden detectarse de cualquier manera adecuada, pero se detecta típicamente poniendo en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo que se une a la proteína, y después detectando la presencia o ausencia de un producto de reacción.

El anticuerpo puede ser monoclonal, policlonal, quimérico o un fragmento de lo anterior, como se analiza en detalle anteriormente, y la etapa de detección del producto de reacción puede realizarse con cualquier inmunoensayo adecuado. La muestra del sujeto es típicamente un fluido biológico como se ha descrito anteriormente, y puede ser la misma muestra de fluido biológico utilizada para llevar a cabo el método descrito anteriormente.

Los inmunoensayos realizados de acuerdo con la presente invención pueden ser ensayos homogéneos o ensayos heterogéneos. En un ensayo homogéneo, la reacción inmunológica implica usualmente el anticuerpo específico, un analito marcado, y la muestra de interés. La señal que surge de la etiqueta se modifica, directa o indirectamente, tras la unión del anticuerpo al analito marcado. Tanto la reacción inmunológica como la detección de la extensión de la misma se realizar en una solución homogénea. Las marcas inmunoquímicas que pueden emplearse incluyen radicales libres, radioisótopos, colorantes fluorescentes, enzimas, bacteriófagos o coenzimas.

En un enfoque de ensayo heterogéneo, los reactivos son habitualmente la muestra, el anticuerpo y los medios para producir una señal detectable. Pueden usarse muestras como las descritas anteriormente. El anticuerpo puede inmovilizarse sobre un soporte, tal como una perla (tal como perlas de agarosa de proteína A y proteína G), una placa o lámina, y se pone en contacto con el espécimen sospechoso de contener el antígeno en una fase líquida. Después, el soporte se separa de la fase líquida y se examina la fase de soporte o la fase líquida para detectar una señal detectable empleando medios para producir dicha señal. La señal está relacionada con la presencia del analito en la muestra. Los medios para producir una señal detectable incluyen el uso de etiquetas radiactivas, etiquetas fluorescentes o etiquetas enzimáticas. Por ejemplo, si el antígeno a detectar contiene un segundo sitio de unión, un anticuerpo que se une a ese sitio puede conjugarse con un grupo detectable y añadirse a la solución de reacción en fase líquida antes de la etapa de separación. La presencia del grupo detectable en el soporte sólido indica la presencia del antígeno en la muestra de ensayo. Los ejemplos de inmunoensayos adecuados son oligonucleótidos, inmunotransferencia, métodos de inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, puntos cuánticos, fluorocromos multiplex, métodos de quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia (ECL) o inmunoensayos ligados a enzimas.

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con numerosos formatos de inmunoensayos específicos y variaciones de los mismos que pueden ser útiles para llevar a cabo el método descrito en el presente documento. Véase en general E. Maggio, Enzyme-Immunoassay, (1980) (CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.); véase también la Pat. de Estados Unidos N.º 4.727.022 de Skold et al. titulada "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application", Pat. de Estados Unidos N.º 4.659.678 de Forrest et al. titulada "Immunoassay of Antigens", Pat. de Estados Unidos N.º 4.376.110 de David et al., tiulada "Immunometric Assays Using Monoclonal Antibodies", Pat. de Estados Unidos N.º 4.275.149 de Litman et al., titulada "Macromolecular Environment Control in Specific Receptor Assays", Pat. de Estados Unidos N.º 4.233.402 de Maggio et al., titulada "Reagents and Method Employing Channeling", y Pat. de Estados Unidos N.º 4.230.767 de Boguslaski et al., titulada "Heterogenous Specific Binding Assay Employing a Coenzyme as Label".

Los anticuerpos pueden conjugarse con un soporte sólido adecuado para un ensayo de diagnóstico (por ejemplo, perlas tales como agarosa de proteína A o proteína G, microesferas, placas, portaobjetos o pocillos formados a partir de materiales tales como látex o poliestireno) de acuerdo con técnicas conocidas, tales como la unión pasiva. Los anticuerpos tal como se describen en la presente invención pueden conjugarse asimismo con marcadores o grupos detectables tales como radiomarcadores (por ejemplo, 35S, 125I, 131I), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) y marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, Alexa, proteína verde fluorescente, rodamina) de acuerdo con técnicas conocidas. Se pueden usar estrategias de detección de anticuerpos de alta sensibilidad que permitan la evaluación de la unión antígeno-anticuerpo en una configuración no amplificada.

Los anticuerpos también pueden ser útiles para detectar modificaciones postraduccionales de proteínas. Dichos anticuerpos detectan específicamente los aminoácidos fosforilados en una proteína o proteínas de interés, y pueden usarse en ensayos de inmunotransferencia, inmunofluorescencia y ELISA descritos en el presente documento. Estos

anticuerpos se conocen bien por los expertos en la técnica y están comercialmente disponibles.

La invención también proporciona la detección de dianas múltiples en una muestra. Las múltiples dianas incluyen el epítopo discreto con el que el anticuerpo de unión a diana tiene afinidad, así como moléculas o estructuras a las que está unido el epítopo. Por lo tanto, la identificación de dianas múltiples incluye la fenotipificación de células basándose en la concentración del mismo marcador de superficie celular en diferentes células. De este modo, la identificación múltiple de diana no se limita al epítopo discreto al que se une el anticuerpo de unión a diana, aunque esto es claramente una forma en la que se pueden identificar dianas múltiples, es decir, en base a la afinidad del anticuerpo de unión a diana.

Se identifican dianas múltiples poniendo en contacto la muestra biológica con anticuerpos adicionales seguidos por un reactivo de marcado adicional específico para los anticuerpos adicionales usando el método descrito anteriormente. Por ejemplo, se preparan subconjuntos de reactivo de marcado con marcadores distintos, por ejemplo, fluoróforos que se distinguen por sus espectros de emisión, por ejemplo, uno que emite en el espectro verde y uno que emite en el espectro rojo. Los subconjuntos de reactivos de etiquetado se añaden entonces a la muestra biológica que contiene los complejos reactivos de detección-diana en una relación controlada, por ejemplo, dos partes de un reactivo de etiquetado (por ejemplo, emisión verde) y una parte del otro reactivo de marcado etiquetado (por ejemplo, emisión roja) por anticuerpo de unión a diana. De esta manera, los complejos inmunomarcados pueden usarse para detectar una diana. Si se añadió otro complejo inmunomarcado a la muestra, se pudo distinguir la diana original de la diana detectada posteriormente.

La muestra se define para incluir cualquier material que pueda contener una diana al que un anticuerpo tenga afinidad. Típicamente, la muestra es de origen biológico y comprende tejido, una célula o una población de células, extractos celulares, homogeneizados celulares, proteínas purificadas o reconstituidas, proteínas recombinantes, fluidos corporales y otros fluidos biológicos, virus o partículas víricas, priones, componentes subcelulares o proteínas sintetizadas. La muestra es un fluido biológico tal como sangre entera, plasma, suero, secreciones nasales, esputo, saliva, orina, sudor, exudados transdérmicos o líquido cefalorraquídeo. Como alternativa, la muestra puede ser órganos, enteros, tejido o células de un animal. Los ejemplos de fuentes de tales muestras incluyen músculo, ojo, piel, gónadas, ganglios linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, tumores sólidos, macrófagos o mesotelio. La muestra se prepara de una manera que hace que el objetivo, que es determinado por el usuario final, en la muestra sea accesible a los complejos inmunomarcados. Típicamente, las muestras utilizadas en la invención están constituidas por tejido o células. Preferiblemente, el tejido o las células a ensayar se obtendrán mediante procedimientos quirúrgicos, por ejemplo, biopsia. El tejido o las células se fijan o se congelan para permitir la sección histológica. La detección in situ se utiliza para determinar la presencia de una diana particular y para determinar la distribución de la diana en el tejido examinado. Las técnicas generales de detección in situ se conocen bien por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application" in Mammalian Development: A Practical Approach, Monk (ed.), 115 (1987). Los tratamientos que permeabilizan la membrana plasmática, tales como electroporación, tratamientos de choque o ATP extracelular alto, pueden ser utilizados para introducir reactivos en las células.

Los métodos de la invención proporcionan ventajas significativas sobre la tecnología existente ya que no dependen de hibridaciones de ácido nucleico. Por lo tanto, los métodos de la invención pueden realizarse en presencia de nucleasas, por ejemplo, nucleasas no específicas, DNasa y RNasa.

Las fuentes adecuadas para anticuerpos para la detección de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilada (pHer2) incluyen fuentes comercialmente disponibles tales como, por ejemplo, Abazyme, Abnova, Affinity Biologicals, AntibodyShop, Biogenesis, Biosense Laboratories, Calbiochem, Cell Sciences, Chemicon International, Chemokine, Clontech, Cytolab, DAKO, Diagnostic BioSystems, eBioscience, Endocrine Technologies, Enzo Biochem, Eurogentec, Fusion Antibodies, Genesis Biotech, GloboZymes, Haematologic Technologies, Immunodetect, Immunodiagnostik, Immunometrics, Immunostar, Immunovision, Biogenex, Invitrogen, Jackson ImmunoResearch Laboratory, KMI Diagnostics, Koma Biotech, LabFrontier Life Science Institute, Lee Laboratories, Lifescreen, Maine Biotechnology Services, Mediclone, MicroPharm Ltd., ModiQuest, Molecular Innovations, Molecular Probes, Neoclone, Neuromics, New England Biolabs, Novocastra, Novus Biologicals, Oncogene Research Products, Orbigen, Oxford Biotechnology, Panvera, PerkinElmer Life Sciences, Pharmingen, Phoenix Pharmaceuticals, Pierce Chemical Company, Polymun Scientific, Polysiences, Inc., Promega Corporation, Proteogenix, Protos Immunoresearch, QED Biosciences, Inc., R&D Systems, Repligen, Research Diagnostics, Roboscreen, Santa Cruz Biotechnology, Seikagaku America, Serological Corporation, Ab Serotec, SigmaAldrich, StemCell Technologies, Synaptic Systems GmbH, Technopharm, Terra Nova Biotechnology, TiterMax, Trillium Diagnostics, Upstate Biotechnology, US Biological, Vector Laboratories, Wako Pure Chemical Industries, y Zeptometrix.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: MÉTODOS GENERALES DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Generalmente se utilizan los siguientes métodos durante los métodos de detección de Multiplex de acuerdo con la invención.

Recuperación del antígeno:

1. Desparafinar y rehidratar las muestras de tejido de acuerdo con el estándar Leica 5020 SOP.
2. Precalentar 250 ml de solución de recuperación de antígeno Reveal a ebullición en baño de agua en microondas (solución de calor durante siete (7) minutos a nivel de potencia siete (7)).
3. Colocar los portaobjetos en el recipiente de la solución 1x Reveal en ebullición. Dejar hervir durante 8,0 minutos como se ha descrito anteriormente.
4. Al completarse, retirar el recipiente del baño de agua al microondas y dejar enfriar durante 20 minutos.
5. Aclarar los portaobjetos en PBS brevemente seguido de 1 x 5 minutos a temperatura ambiente.
6. Colocar los portaobjetos en Nemesis 7200 y comenzar el programa de autotinción.

Permeabilización tisular:

Incubar los portaobjetos en PBT (PBS con Triton-X al 0,2 %) durante 30 minutos. PBT se fabrica como se indica a continuación:

Reactivo	Proveedor	Catálogo n.º	Dilución/[Conc.]	Cantidad	Volumen final
Tampón Difco FA	Fisher	223142	1X	1,0 g	
Triton-X 100	Fisher	BP151-500	0,2%	2,0 ml	
Tween 20 al 20 %	BioCare	TWN20H	1,0%	50,0 ml	
ddH2O	---	---	---	948,0 ml	1000 ml

Eliminación de autofluorescencia:

Incubar los portaobjetos en alcohol de ácido (HCl al 1 % en EtOH al 70 %) durante 20 minutos. El alcohol de ácido se hace como se indica a continuación:

Reactivo	Proveedor	Catálogo n.º	Dilución/[Conc.]	Cantidad	Volumen final
EtOH 200 grados	Sigma	E7023-4L	140 grados	7,28 ml	
HCl	Fisher	A144S-500	1,0%	0,1 ml	
Tween 20 al 20 %	BioCare	TWN20H	1,0%	0,52 ml	
ddH2O	---	---	---	2,5 ml	10,4 ml

Etapas de tratamiento pre-anticuerpo

Para ayudar a permear las estructuras celulares del tejido, las muestras se incuban en PBS que contiene Triton-X 100 al 0,2 % (PBT) a temperatura ambiente durante treinta minutos, seguido de tres aclarados de tres minutos cada uno en PBS. Para ayudar a reducir la autofluorescencia en el tejido, las muestras se incuban en HCl al 1 % en etanol al 70 % a temperatura ambiente durante veinte minutos, seguido de tres aclarados de tres minutos cada uno en PBS. El bloqueo de sitios de unión no específicos se realiza incubando los portaobjetos en Reactivo de Bloqueo al 1 % (10,0 mg/ml de BSA en PBS) a temperatura ambiente durante veinte minutos. No se realizaron lavados entre la etapa de bloqueo y la etapa de hibridación posterior.

Hibridación de anticuerpos específicos diana con muestras biológicas

Los anticuerpos específicos para una diana se hibridan, por ejemplo, como se indica a continuación:

Se diluye un cóctel de anticuerpo AE1/AE3 (citoqueratina), anticuerpo TAB250 (Her2-ECD), anticuerpo c-erb B2 (Her2) y anticuerpo Her 2 fosforilado en Reactivo de Bloqueo al 1 %.

Anticuerpo	Proveedor	Catálogo n.º	Dilución	Isotipo	Etiqueta
AE1/AE3	Dako	M3515	1:100	IgG1 de ratón	488
c-erbB-Intracelular	Dako	A0485	1:10	IgG de conejo	594
Her2 TAB250	Zymed (lnvitrogen)	28-003Z	1:10	IgG1 de ratón	555
Her2-pY-1248	Dako	M7269	1:10	IgG1 de ratón	647

Se aplican aproximadamente 100 µl de este cóctel de anticuerpos a la muestra de tejido, y se permite que los anticuerpos y muestras de tejido hibriden en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante una hora. La hibridación se siguió de dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS, y un aclarado de tres minutos en PBS.

Etiquetado de anticuerpos específicos diana hibridados

Los anticuerpos específicos diana hibridados se marcan por fluorescencia, por ejemplo, como se indica a continuación:

Se prepara un cóctel del fragmento Fab de IgG anti-conejo Zenon Alexa Fluor 488 y fragmento Fab de IgG1 anti-ratón de Zenon Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Carlsbad, CA) en Reactivo de Bloqueo al 1 % en dos veces las concentraciones recomendadas por el fabricante (dilución 1:50 para cada fragmento Fab). Aproximadamente 100 µl de este cóctel de etiquetado se aplican a las muestras de tejido, que luego se incuban en una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción de etiquetado va seguida de dos aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS, y un aclarado de tres minutos en PBS.

EJEMPLO 2: DETECCIÓN MULTIPLEX DE AE1/AE3 (CITOQUERATINA), TAB250 (HER2-ECD), C-ERB B2 (HER2) Y HER 2 FOSFORILADA (PHER2)

Se ha descubierto que AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her2 fosforilada (pHer2) son biomarcadores importantes para la evaluación de tejido canceroso de mama. Se detectaron la distribución cualitativa y cuantitativa de estos marcadores en secciones tisulares fijadas con formalina, embebidas en parafina o micromatrices tisulares como se describe a continuación. Se usaron las líneas celulares de tumores de mama MCF7, T47D y SBR3 o muestras de tejido fijadas con formalina, embebidas en formalina (FFPE) de pacientes con estado HER2 conocido. Para el análisis se utilizaron 26 pacientes (52 núcleos). Se asociaron de forma univariada c-erbB2 y pHER2 con los resultados de HercepTest y ambos fueron seleccionados en un modelo para discriminar Her2 (2+) de Her2 (3+) con un AUC: 0,92, sensibilidad 0,90, especificidad 0,85.

1). Recuperación del antígeno (en solución Reveal, tampón citrato o proteinasa K)

Para la recuperación del antígeno, las secciones tisulares o TMA se calientan en una solución 1X Reveal (BioCare Medical) en una cámara de encubrimiento de acuerdo con el protocolo estándar y luego se deja enfriar durante 15 minutos. Los métodos alternativos de recuperación de antígeno incluyen: 1) secciones tisulares de calentamiento o TMA en tampón de citrato 10 mM, pH 6,0, durante 15 minutos en un microondas calibrado seguido de enfriamiento durante 15 minutos, o 2) secciones de tejido de digestión enzimática o TMA en una solución de proteinasa K (comercialmente disponible en Fisher como reactivo listo para usar para la recuperación de antígeno durante 12 - 15 minutos. Después de aclarar en agua destilada durante 15 minutos (esta etapa se omite para la recuperación de antígeno de proteinasa K), los portaobjetos se lavaron durante 3 x 5 minutos en solución salina tamponada con fosfato (PBS).

2). Eliminación de autofluorescencia

La autofluorescencia se redujo incubando los portaobjetos en HCl al 1 %/EtOH al 70 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se aclararon después durante 3 x 5 minutos en PBS.

3). Permeabilización tisular

El tejido se permeabiliza posteriormente en PBS que contiene Triton X al 0,2 % (PBT) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

4). Bloqueo con IgG no específica

La unión no específica del anticuerpo o fragmento Fab se bloqueó mediante incubación con 0,5 µg/l de BSA en PBT durante 20 minutos en una cámara de humedad. Los portaobjetos se aclaran posteriormente en PBT durante 5 minutos.

6). Incubación de anticuerpos primarios no tratados en el tejido

El anticuerpo se incuba en el tejido durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara de humedad.

7). Eliminación del anticuerpo no unido

El anticuerpo en exceso se elimina lavando los portaobjetos durante 2 x 10 minutos en PBT seguido de 3 x 5 minutos en PBS.

8). Incubación con Fab marcado con fluorescencia

Se añaden fragmentos Fab específicos de ratón y conejo marcados con Alexa 555 y Alexa 594 respectivamente en el portaobjetos y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara de humedad.

9). Eliminación de Fab no unido

El fragmento Fab sin unir se elimina lavando los portaobjetos durante 2 x 10 minutos en PBT seguido de 3 x 5 minutos en PBS.

10). Fijación

Los tejidos se fijan en formalina al 10 % durante 10 minutos. Los portaobjetos se aclararon durante 2 x 5 minutos en PBS.

11). Montaje

Después de añadir 100 µl de solución AntiFade que contenía contracolorante nuclear, los portaobjetos se cubren y se preparan para la captura de imágenes.

12). Adquisición de imágenes

Las muestras se colocan en un microscopio fluorescente automático 90i. Las regiones de interés se identifican moviendo los ejes y-x de la fase del microscopio. El tiempo de exposición de la imagen se ajustó al nivel de brillo más alto posible sin causar sobreexposición. Las imágenes se adquieren con la cámara Nikon 1200DXM CCD o un sistema comparable (como alternativa puede usarse una cámara de imágenes espectrales para la separación espectral avanzada de colorantes fluorescentes). Las imágenes se guardan en formato tiff y se someten a análisis cuantitativo de imágenes.

13). Resultados

A. Un análisis univariado analizó cada uno de los predictores para los dos criterios de valoración (Her2 2+ frente a 3+ y FISH + frente a -)

criterio de valoración	característica	Wald (chi cuadrado)	valor de p
Her2	pY Her-2	6,977	0,0083
Her2	Her-2 (A0485)	12,058	0,0005
Her2	TAB250	9,915	0,0016
Fish	pY Her-2	3,948	0,0469
Fish	Her-2 (A0485)	6,619	0,0101
Fish	TAB250	8,618	0,0033

B) Desarrollo de un punto de corte para cada característica para ambos criterios de valoración y cálculo de la exactitud del chi-cuadrado y asociar el valor de p y el AUC de la clasificación (Figura 2)

criterio de valoración	**característica**	**punto de corte**	**Wald (chi-cuadrado)**	**valor de p**	**AUC**
Her2	pY Her-2	408787	18,907	<0,0001	0,8402
Her2	Her-2 (A0485)	160069	20,139	<0,0001	0,8925
Her2	TAB250	1120000	20,268	<0,0001	0,8641
Fish	pY Her-2	334021	16,386	0,0001	0,8542
Fish	Her-2 (A0485)	134250	20,748	<0,0001	0,9097
Fish	TAB250	1320000	16,386	0,0001	0,8542

C) Modelos multivariados (con selección de características) para cada criterio de valoración:

Criterio de valoración de Her2 (figura 1)

AUC	0,928
Sensibilidad	0,903
Especificidad	0,857
Característica	**peso**
pY Her-2	3,0588
Her-2 (A0485)	5,2093

Criterio de valoración FISH (Figura 3)

AUC	0,964
Sensibilidad	0,917
Especificidad	1
Característica	**peso**
Her-2 (A0485)	3,19188

EJEMPLO 3: EXTRAPOLACIÓN DE NIVELES P95

No hay ningún anticuerpo comercialmente disponible para el receptor truncado (p95) Her2 que funcione bien en muestras de tejido fijadas con formalina y embebidas en parafina. Dada la importancia de p95 en la resistencia a Herceptin se buscó utilizar los reactivos existentes empleados en el multiplex descrito actualmente de la invención para examinar la localización, distribución y nivel de p95 en muestras de tumor de mama. Para identificar p95 en muestras de cáncer de mama, se combinaron los valores de intensidad (es decir, la determinación de píxeles basada en fluorescencia) tanto de las formas de longitud completa (es decir, Her2-A0485) como fosforiladas (Her2-pY1248) de Her2, que son ambas citoplásmicas, y después se restó el nivel de intensidad medido del anticuerpo Her2 que reconoce el dominio extracelular (TAB250) del receptor de longitud completa. Al realizar este cálculo, se formuló la hipótesis de que el valor resultante representará la forma p95 truncada (+/- fosforilación). Los niveles de P95 se han asociado con la resistencia a herceptin y, por lo tanto, es indicativo de una respuesta de los pacientes a terapias tales como lapatinab.

OTRAS REALIZACIONES

Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método implementado por ordenador para determinar uno o más resultados en relación con un sujeto que comprende:

generar, con un aparato de procesamiento de datos, un valor de referencia, correspondiendo el valor de referencia a una cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de control;
midiendo, usando un inmunoensayo, datos que son indicativos de un nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) del sujeto:
poniendo en contacto una muestra de tejido fijada con formalina, embebida en parafina del sujeto con anticuerpos de Her2, Her2-ECD, citoqueratina y pHER2, y
detectando la presencia o ausencia de un producto de reacción;
introduciendo en el aparato de procesamiento de datos los datos que son indicativos del nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) del sujeto;
determinando, por el aparato de procesamiento de datos, un valor de sujeto correspondiente al nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en la muestra de tejido fijada con formalina, embebida en parafina de un sujeto;
comparando el valor de sujeto con el valor de referencia; y
basándose en la comparación del valor de sujeto con el valor de referencia, determinando uno o más resultados en relación con el sujeto.

2. El método de la reivindicación 1,

en el que determinar un valor de sujeto correspondiente a un nivel de expresión de proteína comprende determinar uno o más cambios a través de niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una pluralidad de muestras obtenida del sujeto en una pluralidad de veces; y
en el que la comparación del valor de sujeto con el valor de referencia comprende comparar el uno o más cambios a través de niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en la pluralidad de muestras obtenidas del sujeto en la pluralidad de veces con el valor de referencia.

3. El método de la reivindicación 2, en el que determinar uno o más resultados en relación con el sujeto comprende determinar, en base a uno o más cambios, que un cáncer es progresivo, en el que el uno o más cambios comprenden uno o más cambios en una cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en el tiempo con respecto al valor de referencia.

4. El método de la reivindicación 2, en el que la determinación de uno o más resultados en relación con el sujeto comprende determinar, en base al uno o más cambios, que un cáncer no es progresivo, en el que el uno o más cambios comprenden una consistencia sustancial en una cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en el tiempo con respecto al valor de referencia.

5. El método de la reivindicación 2, en el que la determinación de uno o más resultados en relación con el sujeto comprende determinar, en base al uno o más cambios, que un tratamiento no previene el avance del cáncer, en el que el uno o más cambios comprenden uno o más cambios en una cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en el tiempo con respecto al valor de referencia.

6. El método de la reivindicación 2, en el que la determinación de uno o más resultados en relación con el sujeto comprende determinar, en base al uno o más cambios, que un tratamiento no previene el avance del cáncer, en el que el uno o más cambios comprenden una constancia sustancial en una cantidad de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en el tiempo con respecto al valor de referencia.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el valor de referencia comprende un nivel de muestra compuesta de la expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) de uno o más individuos, siendo el uno o más individuos al menos uno de:

(a) individuos que no tienen cáncer de mama,

(b) individuos que son asintomáticos de cáncer de mama,
(c) individuos que han demostrado una mejora en la respuesta al cáncer de mama a una terapia particular, y
(d) individuos que han mostrado una mejora en la tasa de supervivencia global como resultado de un tratamiento particular.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la determinación de uno o más resultados en relación con el sujeto comprende la definición de un espectro de riesgo de una categoría de sujetos definidos como en riesgo de no responder a la quimioterapia.

9. El método de la reivindicación 1, en el que la determinación de uno o más resultados en relación con el sujeto comprende identificar el sujeto como un sujeto que responderá a una terapia particular.

10. El método de la reivindicación 1, en el que la determinación de un valor de sujeto correspondiente a un nivel de expresión de proteína comprende:

combinar los niveles de expresión de Her2 y pHer2 de la muestra de tejido del sujeto para producir un valor combinado; y
restar un nivel de expresión de TAB250 del valor combinado, y determinar así una cantidad de p95HER2 en la muestra de tejido del sujeto.

11. El método de la reivindicación 10, en el que la determinación de uno o más resultados comprende determinar, basándose en la cantidad de pHER2 en la muestra de tejido del sujeto, al menos una de (a) sensibilidad a herceptin y (b) resistencia a herceptin.

12. El método de la reivindicación 1, en el que el inmunoensayo mide datos que son indicativos de un nivel de expresión de proteína usando inmunofluorescencia.

13. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra de control comprende al menos uno de:

(a) una o más personas que responden a la quimioterapia en el cáncer de mama;
(b) uno o más individuos que tienen una mayor tasa de supervivencia libre de enfermedad por cáncer de mama;
(~~b~~c) uno o más individuos que tienen una mayor tasa de supervivencia global por cáncer de mama;
(d) uno o más sujetos que no están en riesgo de desarrollar una recidiva de cáncer de mama; y
(e) uno o más sujetos con bajo riesgo de desarrollar recidiva de cáncer de mama.

14. Un sistema que comprende:

un medio legible por ordenador; y
un aparato de procesamiento de datos configurado para interactuar con el medio legible por ordenador;
en el que el medio legible por ordenador comprende:
un primer programa de procesamiento de datos configurado para hacer que el aparato de procesamiento de datos genera un valor de referencia, comprendiendo el valor de referencia una cantidad de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una muestra de control;
un segundo programa de procesamiento de datos configurado para:
recibir datos que son indicativos de un nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) de un sujeto, obteniéndose los datos a partir de un inmunoensayo poniendo en contacto una muestra de tejido fijado con formalina y embebida en parafina del sujeto con anticuerpos de Her2, Her2-ECD, citoqueratina y pHER2, y detectar la presencia o ausencia de un producto de reacción; y
hacer que el aparato de procesamiento de datos determine un valor de sujeto correspondiente al nivel de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en la muestra de tejido fijada con formalina, embebida en parafina del sujeto;
un tercer programa de procesamiento de datos configurado para hacer que el aparato de procesamiento de datos compare el valor de sujeto con el valor de referencia; y
un cuarto programa de procesamiento de datos configurado para hacer que el aparato de procesamiento de datos determine uno o más resultados en relación con el sujeto.

15. El sistema de la reivindicación 14,

en el que determinar un valor de sujeto correspondiente al nivel de expresión de proteína comprende determinar uno

o más cambios a través de niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en una pluralidad de muestras obtenida del sujeto en una pluralidad de veces; y

en el que la comparación del valor de sujeto con el valor de referencia comprende comparar el uno o más cambios a través de niveles de expresión de proteína de AE1/AE3 (citoqueratina), TAB250 (Her2-ECD), c-erb B2 (Her2) y Her 2 fosforilado (pHer2) en la pluralidad de muestras obtenidas del sujeto en la pluralidad de veces con el valor de referencia.

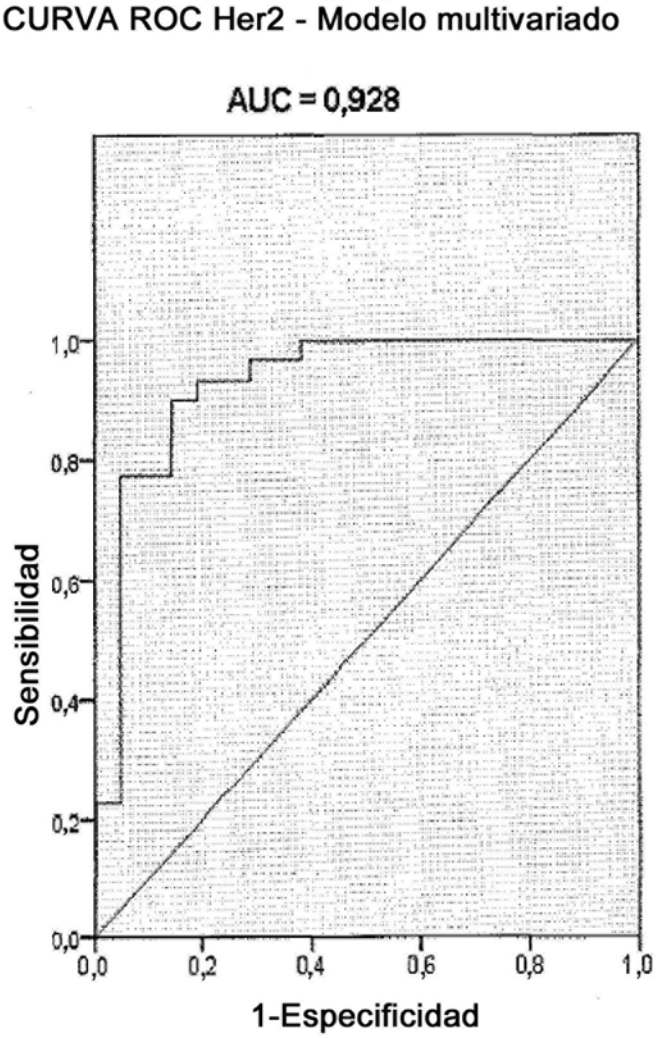
CURVA ROC Her2 - Modelo multivariado
AUC = 0,928
Sensibilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1-Especificidad

Figura 1

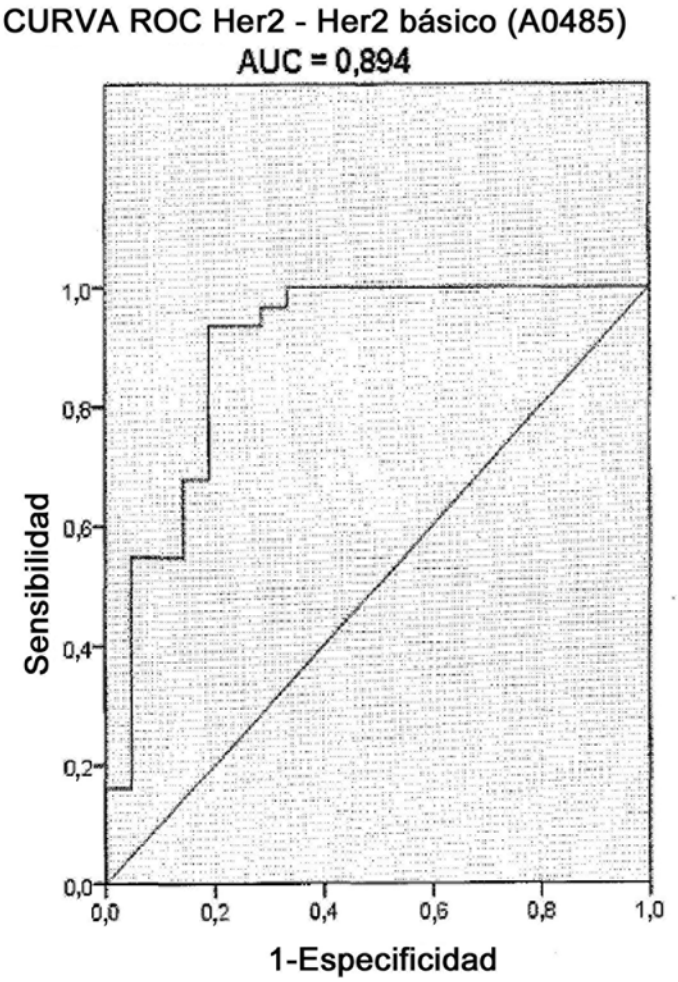
CURVA ROC Her2 - Her2 básico (A0485)
AUC = 0,894
Sensibilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1-Especificidad

Figura 2

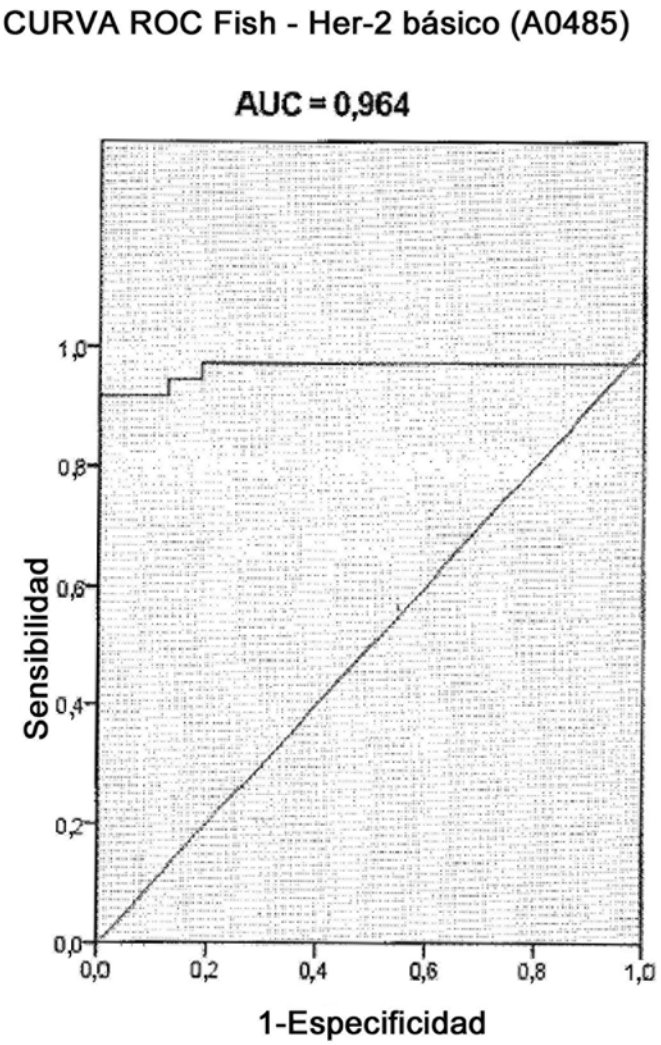
CURVA ROC Fish - Her-2 básico (A0485)
AUC = 0,964
Sensibilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1-Especificidad

Figura 3